



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SURTO DE LISTERIOSE ENTRE 2009 E 2011 EM LISBOA E VALE DO TEJO -
INVESTIGAÇÃO E MEDIDAS IMPLEMENTADAS PELA ASAE

JOANA SERRANO MAIA PITA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Vogais:

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Mestre Maria da Graça Domingues Mariano

Marques Fernandes

ORIENTADOR

Mestre Maria da Graça Domingues

Mariano Marques Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutora Yolanda Maria Vaz

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SURTO DE LISTERIOSE ENTRE 2009 E 2011 EM LISBOA E VALE DO TEJO -
INVESTIGAÇÃO E MEDIDAS IMPLEMENTADAS PELA ASAE

JOANA SERRANO MAIA PITA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Vogais:

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Mestre Maria da Graça Domingues Mariano

Marques Fernandes

ORIENTADOR

Mestre Maria da Graça Domingues

Mariano Marques Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutora Yolanda Maria Vaz

2012

LISBOA

Agradecimentos

Na realização do estágio e na elaboração desta dissertação, várias pessoas contribuíram de algum modo e por isso não podia deixar de lhes agradecer:

Agradeço à minha orientadora Dra. Graça Mariano por ter aceite orientar o meu estágio, por todos os conhecimentos que me transmitiu e que me permitiu adquirir, por todos os desafios que me propôs e por toda a amizade.

Agradeço à minha co-orientadora Doutora Yolanda Vaz por todo o apoio disponibilizado no desenvolvimento desta dissertação, por toda a simpatia e disponibilidade

Agradeço a toda a equipa da ASAE, especialmente à Maria Manuel Mendes, por todos os conhecimentos que me transmitiram, pelas críticas construtivas que me fizeram crescer profissionalmente, pelos momentos de convívio e amizade.

Agradeço à equipa do Gabinete Médico-Veterinário da Câmara Municipal de Sintra, especialmente à Dra. Alexandra Pereira, aos membros da Liga Portuguesa dos Direitos do Animal (Dr. Gonçalo Pereira e Dra. Célia Palma) assim como a outros profissionais que se cruzaram comigo ao longo destes anos de curso e que de algum modo contribuíram para a minha formação, transmitindo-me conhecimentos e proporcionando-me experiências enriquecedoras.

To Professor Marianne and Per, thank you for the opportunity that you gave me to learn and to develop my skills in the laboratory and outside of it and thank you for all the support.

Agradeço aos meus pais e irmão por todo o apoio, paciência, carinho e por me permitirem crescer e à Madalena por nos dar esperança a cada sorriso.

Ao Rodrigo por toda a paciência e compreensão nos momentos difíceis e carinho, amizade e dedicação.

Agradeço aos meus amigos Joana Nabais, Tiago Gonçalves, Fabiana Couto, Patrícia Caeiros, Juliana Carreira e Sílvia Cruz por preencherem estes anos de vida académica com momentos de amizade, companheirismo e divertimento, à Sara Nabais e Mónica Marques por todos os momentos de descontração e amizade proporcionados no período de estágio e de escrita desta dissertação e à Sara Vilas-Bôas pela amizade incondicional.

Resumo

Surto de Listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo - Investigação e Medidas Implementadas pela ASAE

A listeriose humana é uma doença zoonótica transmitida através de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*. Apesar da incidência anual ser baixa, a taxa de fatalidade é muito elevada, assim como a susceptibilidade do grupo de risco (imunodeprimidos, idosos, grávidas e recém-nascidos). Em Portugal a listeriose humana não é de declaração obrigatória dificultando a detecção precoce de surtos.

Entre Janeiro de 2009 e Fevereiro de 2011 foram reportados em Lisboa e Vale do Tejo 46 casos de listeriose, 24 dos quais pertencentes ao mesmo pulsótipo. A investigação epidemiológica foi realizada pela Direcção Geral de Saúde, que aplicou inquéritos epidemiológicos aos doentes.

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) realizou a investigação da origem do surto implementando duas operações de inspecção e colheita de amostras. Foram abrangidos 42 estabelecimentos de retalho, 14 dos quais referidos pelos doentes, e seis indústrias. Uma amostra de queijo de vaca e cabra fresco apresentou contagem de *L. monocytogenes* superior a 100 ufc/g e o mesmo pulsótipo dos isolados clínicos. O estabelecimento industrial (Alentejo) que produziu o queijo foi inspeccionado e cinco das seis amostras colhidas apresentaram-se positivas e com o pulsótipo isolado nos doentes envolvidos no surto, podendo este ser o foco ou um dos focos.

Palavras-chave: Listeriose; Surto; ASAE; Investigação

Abstract

Outbreak of listeriosis between 2009 and 2011 in Lisbon and Tagus Valley - Research and Implemented Measures by ASAE

Listeriosis is a zoonotic disease transmitted through food contaminated with *Listeria monocytogenes*. Although the annual incidence is low, the fatality rate is very high, as well as the susceptibility in the risk group (immunocompromised, elderly, pregnant women and newborns). In Portugal, listeriosis is not notifiable which may difficult the early detection of outbreaks.

Between January 2009 and February 2011 were reported in Lisbon and Tagus Valley 46 cases of listeriosis, 24 of which belong to the same pulsotype. The epidemiological investigation was conducted by the Directorate General of Health of who applied epidemiological surveys to patients.

The Food Safety Authority and Economic (ASAE) investigated the source of the outbreak by implementing two operations of inspection and sampling. Forty two retail outlets were covered, 14 of them were reported by patients, and 6 industries. A sample of cow and goat fresh cheese had more than 100 cfu/g of *L. monocytogenes* and the pulsotype was the same as the clinical isolates. The industry (Alentejo) that produced the cheese was inspected and five of six samples were positive and with the pulsotype isolated in humans involved in the outbreak, which may indicate this industry as its source.

Key words: Listeriosis; Outbreak; ASAE; Investigation

Índice

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Listeria monocytogenes - a bactéria.....	4
2.1.1. História.....	4
2.1.2. Filogenia e posição taxonómica.....	4
2.1.3. Características morfológicas.....	6
2.1.4. Características metabólicas e bioquímicas.....	7
2.1.5. Métodos de detecção e enumeração laboratorial.....	8
2.1.6. Métodos de tipificação.....	11
2.2. Listeria monocytogenes nos alimentos.....	14
2.2.1. Tipos de alimentos.....	14
2.2.2. Incidência.....	15
2.2.3. Contaminação.....	17
2.2.4. Medidas de controlo.....	18
2.3. Listeriose - a doença.....	19
2.3.1. Transmissão.....	19
2.3.2. Listeriose humana.....	20
2.3.3. Listeriose animal.....	32
2.4. Listeriose em Portugal.....	33
2.5. Investigação de Surtos de Toxinfecção Alimentar.....	35
3. Investigação do surto de listeriose e medidas aplicadas pela ASAE.....	37
3.1. Identificação do surto e metodologia da investigação.....	37
3.2. Amostras.....	38
3.3. Recolha e análise dos dados.....	39
3.4. Resultados e discussão.....	39
3.4.1. 1ª Operação.....	39
3.4.2. 2ª Operação.....	53
3.4.3. Indústria de lacticínios com pulsótipo dos isolados clínicos.....	60
3.4.4. Plano Nacional de Colheita de Amostras.....	64
3.4.5. Casos clínicos.....	65
4. Conclusões.....	68
Bibliografia.....	71
Anexos.....	92
Anexo I.....	92
Anexo II.....	93
Anexo III.....	99

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Amostras colhidas no decorrer na 1ª Operação nas diferentes localidades e referência destas no inquérito epidemiológico	40
Gráfico 2 - Número e tipo de amostras colhidas no decorrer da 1ª Operação.....	46
Gráfico 3 - Resultados obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de estabelecimento onde foram colhidas amostras.....	49
Gráfico 4 - Resultados obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de amostra.....	50
Gráfico 5 - Número de amostras positivas a <i>L. monocytogenes</i> no decorrer da 1ª Operação, consoante o tipo de amostra.....	50
Gráfico 6 - Resultados positivos obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de amostra e se o estabelecimento onde foi efectuada a colheita foi referido no inquérito epidemiológico	51
Gráfico 7 - Amostras colhidas no decorrer na 2ª Operação nas diferentes localidades.....	53
Gráfico 8 - Tipo de amostras colhidas nos estabelecimentos no decorrer da 2ª operação....	55
Gráfico 9 - Amostras colhidas e dos resultados obtidos nos estabelecimentos industriais no decorrer da 2ª Operação - indústria	59
Gráfico 10 - Representação gráfica dos resultados das amostras colhidas na indústria de lacticínios.....	62
Gráfico 11 - Representação gráfica dos casos clínicos registados entre Janeiro de 2009 e Fevereiro de 2011.....	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características das espécies de <i>Listeria</i> (Boerlin et al., 1992; Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009).	11
Tabela 2 - Serótipos de <i>Listeria</i> (Ludwig et al., 2009)	13
Tabela 3 - Alguns alimentos associados a contaminação por <i>Listeria monocytogenes</i> (Wagner & McLauchlin, 2008).....	15
Tabela 4 - Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos crus e "prontos para consumo" em diferentes países.....	16

Tabela 5 - Número e tipo de estabelecimentos inspeccionados no decorrer da 1ª Operação	44
Tabela 6 - Estabelecimentos e produtos referidos no inquérito epidemiológico e produtos colhidos no decorrer da 1ª operação.....	45
Tabela 7 - Resultados não satisfatórios observados nos produtos ou equipamentos no decorrer da 1ª operação	47
Tabela 8 - Tipo e número de estabelecimentos inspeccionados e o respectivo número de amostras colhidas no decorrer da 2ª operação a nível do retalho	54
Tabela 9 - Comparação entre as amostras colhidas na 1ª Operação e na 2ª Operação	56
Tabela 10 - Tipo e número de amostras colhidas e zaragatoas efectuadas nos estabelecimentos industriais inspeccionados.....	58

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>L. monocytogenes</i> visualizada através de microscópio electrónico	7
Figura 2 - Meios selectivos utilizados para identificar <i>Listeria</i> : 1 - PALCAM; 2 - OXFORD; 3 - ALOA; 4 - Rapid L'mono	10
Figura 3 - Testes de confirmação de <i>L. monocytogenes</i> : 1- Coloração de Gram; 2- Teste de hemólise; 3 - Teste API.....	10
Figura 4 - Fisiopatologia da infecção por <i>L. monocytogenes</i> (Vazquez-Boland et al., 2001) 26	
Figura 5 - Imagens ao microscópio óptico que demonstram a invasão celular e a difusão célula-a-célula (Vazquez-Boland et al., 2001).....	27
Figura 6 - Invasão celular, difusão célula-a-célula e factores de virulência responsáveis (Vazquez-Boland et al., 2001).....	29
Figura 7 - Caracterização genética por PFGE dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> provenientes de casos humanos (Magalhães et al., 2008).....	34
Figura 8 - Notícia referente ao Surto de listeriose no dia 9 de Agosto de 2010, Diário de Notícias.....	37
Figura 9 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico, realizado pela ARS.	41

Figura 10 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico e das localidades onde ocorreram colheitas de amostras, realizadas pela ASAE, na região Norte, excepto Alter do Chão.....	42
Figura 11 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico e das localidades onde ocorreram colheitas de amostras, realizadas pela ASAE, na região Sul.	43
Figura 12 - Amostras positivas a <i>Listeria</i> no decorrer da 1ª Operação.....	48
Figura 13 - Amostras positivas a <i>Listeria monocytogenes</i> no decorrer da 1ª Operação.....	52

Lista de abreviaturas

ACES - Agrupamentos de Centros de Saúde

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

ALOA - Agar Listeria Ottavani & Agosti

ARS - Administração Regional de Saúde

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BHI - Brain Heart Infusion (Caldo de infusão de cérebro e coração)

CAMP - Christie Atkins Munch-Peterson

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CE - Comunidade Europeia

DGS - Direcção Geral de Saúde

DSP - Departamento de Saúde Pública

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças)

EFSA - European Food Safety Authority (Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos)

EP - Erro Padrão

ESB - Escola Superior de Biotecnologia

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

FSIS - Food Safety and Inspection Service

GTP - Gabinete Técnico Pericial

G + C - Guanina mais Citosina

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos)

InIA - Internalina A

InIB - Internalina B

ISO - International Organization of Standardization

LIFE - Faculty of Life Sciences

LLO - listeriolisina O

LPM - Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam

MELL - *Multilocus enzyme electrophoresis*

Mlp - Metaloprotease

MOX - Modified OXFORD

NGFIS - Netherlands Government Food Inspection Service

OCLA - Oxoid Chromogenic Listeria Agar

OIE - Office International des Epizooties

PALCAM - Polymyxin-Acriflavine-Lithium-Chlorid-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol

PC-PLC - fosfolipase C fosfatidilcolina

PCR - *polymerase chain reaction*

PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*

PI-PLC - fosfolipase C fosfatidilinositol

PNCA - Plano Nacional de Colheita de Amostras

PNPR - Plano Nacional de Pesquisa de Resíduos

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* (Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição)

UCP - Universidade Católica do Porto

ufc - unidades formadoras de colónias

USDA - United States Department of Agriculture

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

WHO - World Health Organization

1. Introdução

Listeria monocytogenes é o agente de listeriose humana e animal e tornou-se num dos microrganismos patogénicos mais estudados das últimas décadas, tanto por parte da indústria alimentar como da comunidade científica. A frequência com que se encontra *L. monocytogenes* nos alimentos, associada à elevada taxa de fatalidade da doença, torna a listeriose um problema grave de Saúde Pública e uma preocupação para a indústria alimentar (Mead et al., 1999). A listeriose é normalmente transmitida por alimentos contaminados e pode ocorrer tanto em casos esporádicos como em surto (World Health Organization [WHO], 1988; Farber & Peterkin, 1991; Mead et al., 1999).

Apesar da exposição à bactéria ser muito comum e do seu carácter ubíquo, a incidência anual é baixa, entre 1,6 a 6 casos por milhão de habitantes. A preocupação desta doença assenta essencialmente na elevada taxa de fatalidade (20-30%), entre as mais altas de todas as infecções transmitidas por alimentos, no seu elevado potencial epidémico, na elevada susceptibilidade de determinados grupos para esta doença (indivíduos imunodeprimidos, idosos, grávidas e recém-nascidos) e das características da bactéria que permitem que esta se mantenha e se multiplique nas instalações industriais alimentares e nos frigoríficos caseiros por muito tempo. *L. monocytogenes* possui propriedades que a favorecem como agente patogénico alimentar: ao contrário de outros agentes é relativamente resistente a pH ácido, a altas concentrações salinas e multiplica-se a temperaturas de refrigeração. Além disso, produz biofilmes que a ajudam a sobreviver durante períodos prolongados nas unidades de produção (Rocourt, Jacquet & Reilly, 2000; Valk et al., 2005; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; European Food Safety Authority [EFSA], 2011).

Possíveis explicações para esta zoonose alimentar ser considerada um importante problema de saúde pública incluem alterações sócio-económicas, como o aumento da esperança média de vida e a melhoria dos cuidados de saúde em doenças prolongadas, levando ao aumento de pessoas consideradas como grupo de risco, assim como alterações dos hábitos alimentares (o aumento do consumo de alimentos “prontos a consumo”) e alterações na indústria alimentar (um recurso superior à refrigeração como principal meio de controlo dos microrganismos nos alimentos) (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Office International des Epizooties [OIE], 2008). Jensen et al. (2010) sugeriram que as alterações na antibioterapia empírica em casos de septicémia podem contribuir para o aumento da incidência de listeriose na Dinamarca. Enquanto que em muitos hospitais dinamarqueses tem sido utilizada a combinação de aminoglicosídeos com penicilinas no tratamento da

sepsis, noutros tem-se recorrido a cefalosporinas como primeira opção, as quais a *L. monocytogenes* é resistente (Jensen et al., 2010).

A estratégia adoptada no combate à listeriose pode variar. Enquanto nos Estados Unidos é utilizada uma política de tolerância zero em que não é permitido detectar *L. monocytogenes* no alimento, na Europa é seguido o Regulamento (CE) nº 2073/2005, em que é permitida uma contagem até 100 ufc/g no retalho. Na indústria, nos alimentos susceptíveis ao crescimento de *L. monocytogenes*, não é permitida presença em 25 g no momento que o alimento deixa de estar sob o controlo do operador da empresa do sector alimentar que o produziu, a menos o que produtor possa demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil.

Em Portugal a listeriose não é uma doença de declaração obrigatória e os dados disponíveis são escassos (WHO, 2000).

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa realizado na Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) entre os meses de Novembro de 2010 e Janeiro de 2011. Neste período foi desenvolvido o trabalho de estágio nas tarefas da responsabilidade desta Unidade Orgânica relativamente à Área Alimentar, nomeadamente:

- Tratamento dos dados recolhidos no âmbito da Operação Listeria;
- Colaboração no planeamento da Operação Listeria e realização de relatório para a Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo;
- Elaborações de Pareceres Técnicos referentes a resultados laboratoriais de amostras de alimentos colhidos assim como da rotulagem correspondente, no âmbito do controlo oficial levado a cabo pela ASAE e respectivo enquadramento legal;
- Participação na organização e coordenação da implementação dos vários planos de vigilância da responsabilidade da ASAE, tais como o Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) e o Plano Nacional de Pesquisa de Resíduos (PNPR);
- Respostas a dúvidas de associações ou particulares sobre a interpretação da legislação alimentar;
- Participação em formações e seminários externos em que esta unidade orgânica participou;
- Colaboração em acções de fiscalização e colheita de amostras em estabelecimentos do sector alimentar, no âmbito da Operação Listeria, executadas pelos inspectores na área geográfica de Lisboa e Vale do Tejo;

- Colaboração em acções de fiscalização executadas pelos inspectores da ASAE a estabelecimentos industriais do sector alimentar, nomeadamente a dois estabelecimentos de lacticínios e um de produtos à base de carne, no Alentejo;
- Colaboração numa auditoria a técnicos de colheita de amostras, no âmbito do Plano Nacional de Pesquisa de Resíduos, num matadouro em Tomar;
- Participação numa perícia a produtos cárneos, realizada pelo Gabinete Técnico Pericial, em Odivelas.

Com o objectivo de complementar os estudos na área de Segurança Alimentar e Microbiologia Alimentar, foi ainda realizado um estágio inserido no programa ERASMUS na LIFE (Faculty of Life Sciences), Universidade de Copenhaga entre os meses de Fevereiro e Maio, sob a orientação da professora Marianne Halberg Larsen. No decorrer deste estágio foi desenvolvido um estudo de detecção de *Listeria monocytogenes* em 25 g, com base no protocolo Nórdico, em 12 amostras de peixe fumado (Halibut - *Reinhardtius hippoglossoides*) colhidas num estabelecimento de retalho em Copenhaga, tendo sido detectada uma amostra positiva e caracterizados os serótipos presentes. O protocolo experimental utilizado é apresentado no Anexo I.

Foi ainda prestada colaboração a um estudante de Doutoramento no desenvolvimento de um modelo preditivo do crescimento de *Listeria monocytogenes* em lacticínios (queijo azul). Neste trabalho foram inicialmente testadas algumas variáveis passíveis de influenciar a contagem de *Listeria monocytogenes*, assim como foi testado o inóculo a ser utilizado e os diferentes meios selectivos (ALOA, RAPID'L.mono e OCLA - Oxoid Chromogenic Listeria Agar). Posteriormente foram realizadas contagens de *L. monocytogenes* de modo a construir curvas de crescimento da bactéria, em meio sólido de agar, à superfície e incorporado no meio e em queijo inoculado, à superfície e no interior do queijo. Foi igualmente realizada a confirmação de uma das estirpes (ATCC 19113) através da técnica de PCR (primers *hly* e *plcB*).

No âmbito das várias actividades realizadas no estágio foram seleccionados os seguintes objectivos específicos para a presente dissertação:

- Apresentar a revisão bibliográfica sobre *Listeria* e listeriose;
- Descrever o surto de listeriose ocorrido em Portugal - Lisboa e Vale do Tejo em 2009/2010 e apresentar e avaliar as medidas tomadas pela ASAE no decorrer da “Operação Listeria” para a investigação e controlo do surto.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Listeria monocytogenes* - a bactéria

2.1.1. História

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva ubiquitária que foi descrita e publicada pela primeira vez por Murray, Webb e Sawnn (1926) em Cambridge como a causa da infecção em coelhos.

Apesar de G. Hulpers ter descrito uma bactéria que causava necrose hepática em coelhos e, por essas características deu-lhe o nome de *Bacillus hepatis*, este autor não deixou nenhum isolado ou registo (Rocourt & Buchrieser, 2007). Murray et al. (1926) observaram em 1924 seis casos de morte súbita em coelhos jovens com lesões semelhantes entre si, levando-os a investigar a causa. Em 1926, sem qualquer referência anterior, o grupo de cientistas isolou a bactéria e descreveu-a pela primeira vez, dando-lhe o nome de *Bacterium monocytogenes*, devido à monocitose provocada por esta.

No decorrer da morte de gerbilos (*Tatera lobengulae*) em Joanesburgo, Pirie (1927) isolou o mesmo microrganismo. A este nomeou-o de *Listerella hepatolytica*, em honra do cirurgião britânico Lord Joseph Lister e à doença nomeou-a de “Doença do Rio Tigre”, pela proximidade com o rio Tigre na África do Sul (Pirie, 1927). Quando as duas espécies foram identificadas como sendo as mesmas, os investigadores Murray e Pirie decidiram nomear o agente de *Listerella monocytogenes* mas este nome não foi aceite pelo Comité de Bacteriologia Sistemática por já haver registos anteriores; em 1940, Pirie propôs o nome de *Listeria* (Pirie, 1940). *L. monocytogenes* foi isolada pela primeira vez na espécie humana no ano de 1929 por Nyfeldt em Copenhaga (Nyfeldt, 1929).

2.1.2. Filogenia e posição taxonómica

Até à oitava edição do *Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey* (1974), o género *Listeria* estava incluído na família *Corynebacteriaceae*. Nessa edição passou a ser considerado como um género com afiliação incerta e foi então posicionado com *Erysipelothrix* e *Caryophanon*. Em 1986, foi classificado juntamente com *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Caryophanon* na secção de “bacilos Gram-positivos, não esporulados” (Rocourt & Buchrieser, 2007).

Com a introdução e desenvolvimento de novas técnicas moleculares e genéticas, a posição filogenética do género *Listeria* tem sido esclarecida.

Através da taxonomia numérica, Feresu e Jones (1988) distinguiram a posição do género *Listeria* com a de outros géneros, tais como *Erysipelothrix* e *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) e aproximaram-na dos géneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. No entanto, com base na sequenciação de ARN (Ácido ribonucleico) ribossómico 16S, Collins et al. (1991) consideram que o género *Listeria* é filogeneticamente afastado do género *Lactobacillus*. “The sequence data clearly demonstrated that the genus *Listeria* is phylogenetically remote from the genus *Lactobacillus* and should not be included in an extended family *Lactobacillaceae*” (Collins et al., 1991). Esta distinção foi igualmente confirmada através da sequenciação de ARN ribossómico 23S, em que o género *Listeria* apresenta uma proximidade elevada com os géneros *Bacillus* e *Staphylococcus* (Sallen, Rajoharison, Desvarenne, Quinn & Mabilat, 1996). O conteúdo em guanina (G) + Citosina (C) da *L. monocytogenes* varia entre 36-42% (Feresu & Jones, 1988; Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009) indicando a proximidade ao grupo de géneros de bactérias Gram-positivas com baixa percentagem em G+C (Guanina mais Citosina) no ADN (Ácido desoxirribonucleico) (<55%), tais como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, pertencentes à classe *Bacilli* (Barbuddhe, Hain & Chakraborty, 2008). Com base na sequenciação de ARN ribossómico 16S (e de outros genes), os membros do género *Brochothrix* são os mais próximos do género *Listeria* (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). Assim, *L. monocytogenes* apresenta a seguinte classificação taxonómica:

Filo - *Firmicutes*

Classe- *Bacilli*

Ordem - *Bacillales*

Família - *Listeriaceae*

Género - *Listeria*

Espécies - *Listeria monocytogenes*

Listeria grayi

Listeria innocua

Listeria welshimeri

Listeria ivanovii

Listeria seeligeri

Até 1948, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do género *Listeria*. A espécie *L. denitrificans* (pela capacidade de reduzir nitratos) foi a primeira a ser adicionada ao género no referido ano e *L. grayi* foi adicionada em 1966 em honra de M. L. Gray, um microbiologista Americano (Rocourt & Buchrieser, 2007). *L. murrayi* foi adicionada ao género *Listeria* em 1971, em honra do microbiologista Canadano E.G.D. Murray (Welshimer & Meredith, 1971) e *L. innocua* (por ser inofensiva) em 1981 (Seeliger, 1981). Em 1983, foram adicionadas as espécies *L. welshimeri*, em honra de H. J. Welshimer, um microbiologista Americano e *L. seeligeri*, em honra de H. P. R. Seeliger, um microbiologista Alemão (Rocourt & Grimont, 1983) e *L. ivanovii* foi acrescentada em honra de I. Ivanov, um microbiologista Búlgaro em 1985 (Seeliger, Rocourt, Schertrnrunner, Grimont & Jones, 1984). Assim, segundo o *Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey* de 1986, o género *Listeria* consistia em oito espécies. A introdução dos métodos de biologia molecular permitiu uma análise da diversidade dentro do género *Listeria* levando a que actualmente sejam descritas seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). *L. denitrificans* foi excluída do género *Listeria* e reclassificada como *Jonesia denitrificans* (Bell & Kyriakides, 2003) e as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* não foram consideradas suficientemente diferentes e foram incluídas na mesma espécie, *L. grayi* (Rocourt, Boerlin, Grimont, Jacquet & Piffaretti, 1992). Das seis espécies descritas, apenas a *L. monocytogenes* e a *L. ivanovii* são patogénicas (Liu, 2006). *Listeria ivanovii* por sua vez divide-se em duas subespécies, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (Boerlin et al., 1992).

2.1.3. Características morfológicas

Listeria é um bacilo Gram positivo com 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento e com extremidades arredondadas (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). As bactérias apresentam-se isoladas ou em pequenas cadeias em forma de V ou Y. *Listeria* não produz esporos nem forma cápsula (Seeliger & Bockemühl, 1968) e é móvel devido aos flagelos peritricos, quando cultivada a temperaturas inferiores a 30°C (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). Esta motilidade é típica da bactéria - “tumbling motility” e é dependente da temperatura, devido à produção de flagelina. A produção desta proteína é mais marcada entre os 20-25°C e diminui drasticamente a partir dos 37°C (Peel, Donachie & Shaw, 1988; Farber & Peterkin, 1991).

As colónias de *Listeria*, após 24 horas de incubação em meio sólido de agar, são circulares, pequenas (0,5 a 1,5 mm de diâmetro), lisas, ligeiramente convexas, translúcidas e com os bordos definidos (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). Após uma incubação prolongada (3 a 7 dias) as colónias apresentam-se maiores (3 a 5 mm), com uma ligeira opacidade e podem apresentar-se rugosas (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009); esta conversão é irreversível

(Rocourt & Buchrieser, 2007). A 3-5 mm da superfície, ocorre uma zona de crescimento máximo com uma imagem típica de “chapéu de chuva” (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). As colónias, quando observadas à iluminação normal, apresentam uma tonalidade cinzenta e ao microscópio binocular com luz incidente oblíqua (iluminação de Henry) apresentam uma coloração verde-azulada característica (Lachica, 1990).

Em meio líquido, este torna-se turvo após 8 a 24 horas e em meio semi-sólido (cultura através de zaragatoa) é produzida uma imagem típica de “chapéu de chuva”, a 0,5 cm abaixo da superfície, devido à natureza microaerófila do organismo (Rocourt & Buchrieser, 2007).

Figura 1 - *L. monocytogenes* visualizada através de microscópio electrónico



2.1.4. Características metabólicas e bioquímicas

Listeria apresenta características que levam a uma multiplicação em variados ambientes tais como ser aeróbia, microaerófila e anaeróbia facultativa, ser psicrotrófica (consegue multiplicar-se a partir dos 0-1°C até aos 45°C, apresentando um crescimento óptimo entre os 30°C e 37°C), ser resistente a valores de pH de 4,5 a 9, sendo o pH óptimo de multiplicação de 7, tolerar concentrações de cloreto de sódio de 10% a 30% e crescer em meios com actividade da água (aW) de 0,93 (Rocourt & Buchrieser, 2007). A temperatura mínima de crescimento da maioria das estirpes de *L. monocytogenes* é entre 1-2°C (Junttila, Niemelä & Hirn, 1988) e não sobrevive acima dos 60°C por 30 minutos (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009).

A parede celular das espécies de *Listeria* é semelhante às outras bactérias Gram positivas, sendo essencialmente composta por peptidoglicanos, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos (Wagner & McLauchlin, 2008).

Como requisitos nutricionais, a maioria das estirpes de *L. monocytogenes* necessitam de cisteína, valina, isoleucina e leucina para se multiplicarem e nenhuma requer aspargina, glutamina, prolina, histidina e tirosina como factor essencial/estimulante de crescimento

(Siddiqi & Khan, 1989). A fenilalanina e o Fe^{3+} estimulam o crescimento e a glucose e a glutamina são necessárias como fonte primária de carbono e azoto (Premaratne, Lin & Johnson, 1991). Premaratne et al. (1991) descobriram que a quitina e as paredes celulares das bactérias que funcionam como starter (*Lactococcus lactis*) permitem a sobrevivência da *L. monocytogenes*, sugerindo que esta bactéria obtém carbono e fonte de energia durante a colonização dos alimentos lácteos (Premaratne, Lin & Johnson, 1991).

Listeria apresenta reacção catalase positiva e oxidase negativa e apresenta positividade ao testes vermelho metilo e Voges- Proskauer (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009).

As espécies de *Listeria* sob condições de aerobiose fermentam a glucose, formando ácido láctico, ácido acético e acetoína e, sob condições de anaerobiose, não se forma acetoína mas forma-se ácido láctico (Pine, Malcolm, Brooks & Daneshvar, 1989). Produz ácido através da fermentação de açúcares como a glucose, manose, maltose e fructose, sem produção de gás e hidrolisa a esculina mas não a ureia. A gelatina, caseína e o leite também não são hidrolisados pela *Listeria* (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009).

2.1.5. Métodos de detecção e enumeração laboratorial

De modo geral, as espécies do género *Listeria* multiplicam-se em quase todos os meios bacteriológicos não selectivos, tais como Triptona de soja e Caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion). A dificuldade reside muitas vezes no isolamento quando a bactéria está presente em pequenas quantidades na amostra e esta está contaminada por outra flora bacteriana. Existe uma ampla variedade de meios selectivos para o isolamento de *Listeria* a partir de amostras não estéreis como alimentos, amostras do meio ambiente, amostras clínicas e fezes. Têm sido desenvolvidos vários protocolos para detectar *L. monocytogenes* nos vários tipos de amostras (Wagner & McLauchlin, 2008).

Os métodos mais comumente utilizados para a detecção de *L. monocytogenes* são o método USDA–FSIS (United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service) para a detecção em carne, o protocolo FDA (Food and Drug Administration) para a detecção em lacticínios, fruta e frutos do mar, o método NGFIS (Netherlands Government Food Inspection Service) e o ISO (International Organization Standardization) 11290 para todo o tipo de amostras (Churchill, Lee & Hall, 2006; Zunabovic, Domig & Kneifel, 2010). Estes métodos variam no meio de enriquecimento e no meio selectivo utilizado: após um período de enriquecimento, as culturas são semeadas em meios selectivos para isolamento das colónias de *L. monocytogenes* ou outra espécie de *Listeria*, se presentes. Estes meios contêm compostos como acriflavina (para inibir outras bactérias Gram positivas) e ácido nalidíxico (para inibir bactérias Gram negativas), entre outros (Churchill et al., 2006).

O método USDA-FSIS utiliza o meio modificado de OXFORD (MOX - Modified OXFORD), o método FDA utiliza tanto o meio de OXFORD como o de PALCAM (Polymyxin-Acriflavine-Lithium-Chlorid-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol) ou LPM (Lithium-Chloride-Phenylethanol-Moxalactam) e o método NGFIS utiliza o meio PALCAM. Nos meios selectivos de OXFORD e PALCAM as colónias de *Listeria* são pequenas, pretas e rodeadas por um halo preto (proveniente da hidrólise da esculina) (Figura 2) e não se distinguem colónias de *Listeria* spp. patogénica ou não (Zunabovic et al., 2010).

O método ISO 11290 é o recomendado pelo Regulamento (CE) 2073/2005, sendo por isso um dos mais utilizados. Neste existem dois passos de enriquecimento e, posteriormente, são utilizados dois meios selectivos, o meio cromogénico ALOA (agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) e outro, segundo a escolha do laboratório, como o OXFORD ou PALCAM. No meio ALOA as colónias de *L. monocytogenes* têm sensivelmente 1 mm de diâmetro e são tipicamente verde-azuladas rodeadas com um halo opaco (Figura 2).

A enumeração de *Listeria* é tão importante quanto a detecção e esta pode ser efectuada através dos protocolos anteriormente referidos. Para determinar a quantidade de Unidades Formadoras de Colónia (ufc) por grama de amostra de *Listeria* procede-se a uma sementeira (após diluição) em meios selectivos como OXFORD. Se se pretende uma contagem de *L. monocytogenes* existem meios cromogénicos como ALOA e Rapid L'mono que a distinguem das outras espécies.

Após o isolamento nos meios selectivos devem ser efectuados testes de confirmação e, de acordo com o método ISO 11290, as colónias devem ser semeadas no meio triptona de soja com extracto de levedura (TSYEA - Tryptone Soya Yeast Extract Agar) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Se as colónias suspeitas forem semelhantes às de *Listeria* (opacas, incolores e de bordos definidos) deve ser efectuado o teste de coloração de Gram e o teste de motilidade. Este último deve ser positivo na presença de colónias de *Listeria* e, se o teste de catalase for igualmente positivo, deve-se então confirmar a espécie. A *Listeria monocytogenes* é produtora de β -hemolisina (exibe um halo de hemólise em meio com sangue de ovelha), utiliza a ramnose como fonte de açúcares e exibe positividade no teste CAMP (Christie Atkins Munch Peterson), em meio com sangue de ovelha, com *Staphylococcus aureus* mas negatividade com *Rhodococcus equi* (Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). Estas características estão descritas para outras espécies de *Listeria* na Tabela 1. Outra opção para distinguir as espécies de *Listeria* é o método rápido bioquímico API (bioMérieux®) (Figura 3).

Figura 2 - Meios selectivos utilizados para identificar *Listeria*: 1 - PALCAM; 2 - OXFORD; 3 - ALOA; 4 - Rapid L'mono

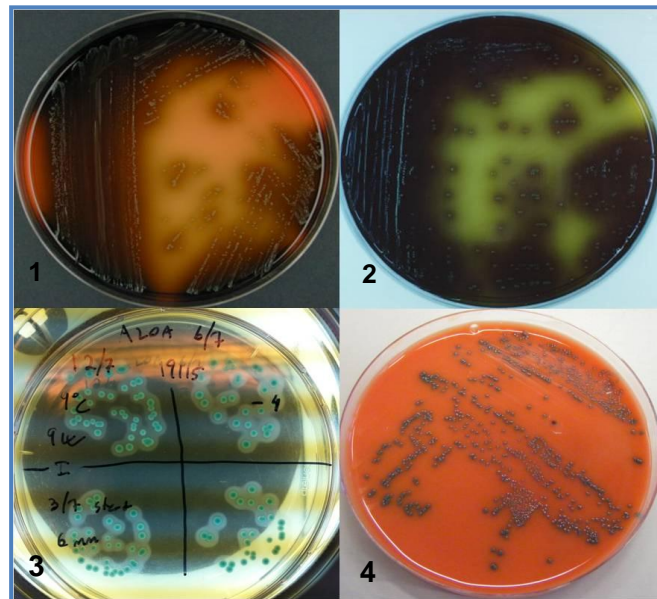


Figura 3 - Testes de confirmação de *L. monocytogenes*: 1- Coloração de Gram; 2- Teste de hemólise; 3 - Teste API

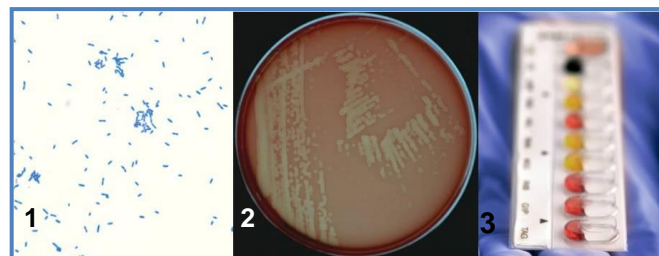


Tabela 1 - Características das espécies de *Listeria* (Boerlin et al., 1992; Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009).

	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>L.</i> <i>innocua</i>	<i>L.</i> <i>seeligeri</i>	<i>L.</i> <i>welshimeri</i>	<i>L.</i> <i>grayi</i>	<i>L.</i> <i>ivanovii</i> <i>Ivanovii</i>	<i>L.</i> <i>ivanovii</i> <i>londoniensis</i>
“Tumbling Motility”	+	+	+	+	+	+	+
Produção de Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Produção de lipase	+	-	+	-	-	+	+
B-Hemólise	+	-	+	-	-	+	+
Produção de ácido a partir de:							
L-ramnose	+	+-	-	+-	+	-	-
D-xylose	-	-	+	+	-	+	-
D- manitol	-	-	-	-	+	-	-
α-Methyl D-mannoside	+	+	-	+	+	-	-
CAMP-test:							
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	-	+	+

+ Teste positivo; - Teste negativo; +- Teste com resultado variável

2.1.6. Métodos de tipificação

Os métodos de tipificação, sejam fenotípicos ou genotípicos, são ferramentas que, no decorrer de estudos epidemiológicos, permitem aos investigadores correlacionar os isolados, identificar a fonte de surtos ou estabelecer modos de transmissão dos organismos. No contexto da indústria alimentar permitem determinar a origem da contaminação do produto e identificar os pontos de persistência dos microrganismos patogénicos na linha de produção (Graves, Swaminathan & Hunter, 2007).

Os métodos de tipificação fenotípica incluem a serotipagem, a fagotipagem e electroforese - multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) e os métodos de tipificação genotípica são a electroforese - pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a ribotipagem e as técnicas de subtipificação baseadas em PCR (Liu, 2006).

A serotipificação é um método que se baseia em reacções de aglutinação entre as células que contêm o(s) antígeno(s) e o soro específico. Este tem um poder discriminatório fraco quando comparado com outros métodos; no entanto, fornece informações importantes na triagem rápida de amostras durante um surto, permitindo eliminar os isolados negativos e aplicar mais eficientemente métodos mais sensíveis mas mais demorados (Graves et al., 2007).

As espécies de *Listeria* possuem múltiplos marcadores de superfície, tais como somáticos (O) e flagelares (H), que são úteis na detecção serológica. Existem 15 subtipos de antígenos somáticos (I–XV) e 4 subtipos flagelares (A–D) (Ludwig et al., 2009) e a combinação única destes antígenos determinam o serótipo da *Listeria*, como se pode ver na Tabela 2.

Assim, as espécies de *Listeria* são divididas em 15 diferentes serótipos, 13 dos quais foram identificados na *L. monocytogenes*. (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab 4b, 4c, 4d, 4e e 7), quatro serótipos na *L. seeligeri* (1/2b, 4c, 4d e 6b), três na *L. innocua* (4ab, 6a e 6b), dois na *L. welshimeri* (6a e 6b), um na *L. ivanovii* (5) e na *L. grayi* não estão definidos nenhum serótipo (Ludwig et al., 2009).

A maioria dos casos humanos de listeriose devem-se aos serótipos 1/2a, 1/2b e 4b, sendo que o serótipo 4b é isolado principalmente em surtos, enquanto os serótipos 1/2a e 1/2b são associados a casos esporádicos (Liu, 2006). Através de métodos de tipificação genética, *L. monocytogenes* pode ser separada em três linhagens genéticas: linhagem I composta pelos serótipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, linhagem II com os serótipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e linha III com os serótipos 4a e 4c (Brosch, Chen, & Luchansky, 1994; Wiedmann et al., 1997).

Os isolados pertencentes à linhagem I predominam em infecções humanas, os isolados da linhagem II provêm essencialmente de alimentos e do meio ambiente enquanto os isolados da linhagem III ocorrem frequentemente em animais (Wesley, 2007).

Tabela 2 - Serótipos de *Listeria* (Ludwig et al., 2009)

Serótipo	Antigénio O	Antigénio H
1/2a	I, II, III	A, B
1/2b	I, II, III	A, B, C
1/2c	I, II, III	B, D
3a	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B
3b	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, III, IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	III, (V), VII, IX	A, B, C
4ab	III, V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	III, V, VI	A, B, C
4c	III, V, VII	A, B, C
4d	III, (V), VI, VIII	A, B, C
4e	III, V, VI (VIII), X	A, B, C
7	III, XII, XIII	A, B, C
5	III, V, VI, (VII), X	A, B, C
6a	III, V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b	III, (V), (VI) (VII), IX, XXI	A, B, C

() – Factores que não estão sempre presentes

PFGE é um método genotípico altamente reproduzível, discriminatório e efectivo que consegue distinguir estirpes muito próximas que são indistinguíveis por outros métodos de tipificação (Graves et al., 2007). Este método baseia-se na técnica RFLP (Restriction fragment length polymorphism) mas distingue-se desta por separar o ADN bacteriano em grandes fragmentos e por, ao aplicar-se uma corrente alternada, obter-se fragmentos com uma resolução superior. As bactérias de *L. monocytogenes* são incorporadas em gel onde sofrem lise e o ADN é então digerido por enzimas de restrição. Os pedaços de gel com o ADN digerido são incorporados em gel de agarose e sofrem uma electroforese durante 30-

50h, com corrente alternada, resultando em 8 a 25 bandas largas de ADN com 40–600 kb de tamanho (Graves & Swaminathan, 2001; Liu, 2006).

PFGE classifica a *L. monocytogenes* em subtipos (pulsótipos) com elevada sensibilidade e discriminação (Brosch et al., 1994). Actualmente é utilizado na investigação de surtos e no controlo das instalações de indústria alimentar e é considerado o método standard de referência para a *L. monocytogenes* e utilizado internacionalmente (Graves & Swaminathan, 2001).

Nos Estados Unidos, o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) estabeleceu uma rede Internacional (PulseNet) de saúde pública e de laboratórios de alimentos que rotineiramente realizam análises ao subtipo de bactérias patogénicas isoladas nos alimentos. Os laboratórios PulseNet utilizam protocolos altamente padronizados de PFGE e são capazes de comparar rapidamente pulsótipos de bactérias de vários pontos do país através da Internet. A análise rotineira de subtipos de *L. monocytogenes* permite que os investigadores detectem e investiguem mais rapidamente surtos de listeriose (CDC, 2011).

2.2. *Listeria monocytogenes* nos alimentos

2.2.1. Tipos de alimentos

L. monocytogenes tem sido isolada ao longo dos anos de todas as categorias de alimentos e estes têm sido apontados como as fontes de contaminação de surtos de listeriose (Farber & Peterkin, 1991). Alguns dos alimentos identificados como veículo de *Listeria* encontram-se discriminados na Tabela 3. Estes, assim como outros alimentos “prontos para consumo”, apesar de apresentarem diferentes constituições, oferecem características que permitem o crescimento desta bactéria, tais como, serem altamente processados, apresentarem uma data de durabilidade mínima longa a temperaturas de refrigeração e serem consumidos sem nenhum processamento térmico (McLauchlin, 1996). Os alimentos “prontos para consumo” podem ser contaminados durante o processamento e devido à capacidade da *L. monocytogenes* se multiplicar a temperaturas de refrigeração, o principal meio para controlo destes microrganismos, esta pode atingir níveis muito elevados durante o armazenamento (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

De acordo com o Regulamento (CE) 2073/2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *L. monocytogenes* não deve estar presente acima das 100 ufc/g durante o seu período de vida útil, quando colocado no mercado. Nos alimentos em que é possível ocorrer o crescimento da bactéria, esta deve estar ausente em 25 g antes

do produto deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar, a menos que o produtor possa demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil.

Tabela 3 - Alguns alimentos associados a contaminação por *Listeria monocytogenes*
(Wagner & McLauchlin, 2008)

Alguns alimentos associados a contaminação por <i>Listeria monocytogenes</i>				
Lacticínios	Carne	Peixe	Vegetais	Outros
Queijo fresco	Frango cozinhado	Marisco	Salada Coleslaw	Sandes
Leite cru	Salsichas	Camarão	Cogumelos salteados	
Gelados	Patés	Peixe fumado	Alfafa	
Manteiga	Língua de porco em gelatina	Ovas de bacalhau	Vegetais crus	
			Azeitonas em vinagre	
			Salada de arroz	

2.2.2. Incidência

Sendo *Listeria monocytogenes* uma bactéria ubiquitária, é frequente isolá-la do solo, águas fluviais e poluídas e animais. A Tabela 4 apresenta a percentagem de amostras positivas em alguns alimentos em países da Europa e nos Estados Unidos da América e esta demonstra que a incidência de *L. monocytogenes* nos alimentos é muito variável.

Os dados relativos aos Estados-Membros em 2009, compilados no relatório da EFSA, demonstram que na pesquisa de *L. monocytogenes* nos produtos “prontos para consumo”, a nível do retalho, poucas amostras apresentavam uma contagem acima das 100 ufc/g, ou seja, acima dos limites legais. Os alimentos que apresentaram uma maior não conformidade neste critério foram os queijos de pasta mole (1,1%), produtos piscícolas “prontos para consumo” (1,0%) e produtos cárneos “prontos para consumo”, excepto salsichas fermentadas (0,3 %). Relativamente ao critério imposto na fase de produção, ausência em 25 g de alimento, para amostras únicas, a maioria dos incumprimentos foi registada em produtos cárneos “prontos para consumo”, excepto salsichas fermentadas (6,7%), produtos piscícolas “prontos para consumo” (6,6%) e em outros produtos “prontos para consumo” (1,8%). Para amostras de lotes, a maior taxa de não conformidades foi registada em produtos piscícolas “prontos para consumo” (5,3%), em queijos de pasta mole (1,3%) e em lotes de produtos de outros alimentos “prontos para consumo” (1,2%) (EFSA, 2011).

Tabela 4 - Ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos crus e "prontos para consumo" em diferentes países

Alimentos crus	Incidência (%)	Fonte
Portugal		
Leite (ovelha, vaca e cabra)	2%	Guerra, Mclauchlin & Bernardo, 2001
Carne de galinha	60%	Mena et al., 2004
Peixe	12%	
Espanha		
Leite de cabra	2,56%	Gaya, Saralegui & Medina, 1996
Dinamarca		
		Nørrung, Andersen & Schlundt, 1999
Carne	30,9%	
Peixe	14,2%	
USA		
Caranguejo	3%	Thimothe, Walker & Suvanich, 2002
Alimentos “prontos para consumo”	Incidência (%)	Fonte
Portugal		
Queijo de pasta semi-dura de ovelha	44%	Guerra et al., 2001
Produtos à base de carne ^a	21%	
Fiambre	25%	Mena et al., 2004
Queijo fresco	4%	
Espanha		
Salada	10,3%	Simón & Ferrer, 1998
Dinamarca		
Salmão fumado	40%	Jørgensen & Huss, 1998
USA		
Salada	embalada	Gombas, Chen & Clavero, 2003
Queijos	0,74% 0,71%	

^a Fiambre, salsichas, chouriço, bacon, salame, paté, salada de carne

Em relação aos dados compilados pela ASAE em 2010, no âmbito do PNCA, das 578 amostras colhidas a nível do retalho e testadas para o parâmetro *Listeria monocytogenes*, 15 apresentaram-se não conformes (com contagem acima de 100 ufc/g), representando uma taxa de positividade de 2,6%. Das 15 amostras positivas 7 (num total de 117 amostras)

eram de queijo, 6 (num total de 196) de produtos à base de carne e 2 (num total de 81 amostras). de prato cozinhado, representando assim taxas de positividade de 5,98%, 3,06% e 2,46%, respectivamente (ASAE, comunicação pessoal, 2011).

2.2.3. Contaminação

A contaminação dos alimentos pode ocorrer desde a colheita ao processamento, no retalho ou no consumidor mas geralmente ocorre durante a fase de processamento do alimento na fábrica. Após a introdução de *Listeria* nas instalações esta pode persistir por um longo período de tempo (Miettinen, Bjorkroth & Korkeala, 1999; Vogel, Huss, Ojeniyi, Ahrens, & Gram, 2001). *L. monocytogenes* apresenta características, referidas anteriormente, que levam à sua sobrevivência nas instalações fabris e que levam a que esta bactéria seja uma ameaça à segurança sanitária dos alimentos (Vázquez-Boland et al., 2001).

O nível de contaminação dos alimentos (quantidade de bactérias presente) é ocasionalmente superior a 10^3 ufc/g (podendo atingir valores de 10^7 ufc/g em queijo), apesar de normalmente ser inferior a 10^2 ufc/g (Pini & Gilbert, 1988; McLauchlin, Greenwood & Pini, 1990; Wilson, 1996; Cortesi, Sarli, Santoro, Murru & Pepe, 1997; Awaisheh, 2010).

Para se compreender como ocorre a contaminação na cadeia de produção de vários alimentos (camarão, gelado, salmão e truta fumados, carne) foram realizados estudos baseados na caracterização molecular de *Listeria monocytogenes*. Estes concluíram que o produto cru pode representar uma entrada de *L. monocytogenes* na fábrica mas não parece ser a principal fonte de contaminação do produto final. A contaminação dos alimentos parece ocorrer essencialmente durante o processo de fabrico no contacto com superfícies ou máquinas (Destro, Leitão & Farber, 1996; Miettinen et al., 1999; Autio et al., 1999; Dauphin, Ragimbeau & Malle, 2001; Vogel et al., 2001; Suihko et al., 2002).

O processo de higienização nem sempre é eficaz nos equipamentos pois *Listeria monocytogenes* aloja-se em nichos onde é difícil ocorrer uma penetração eficaz dos detergentes e dos desinfetantes. A bactéria adere às superfícies, tais como aço inoxidável, vidro, madeira, porcelana, ferro, plástico, poliéster, borracha e papel, e cresce numa rede denominada biofilme que a protege das condições adversas. Os biofilmes formam-se por deposição das células e adesão à superfície, colonização, formação e desenvolvimento do biofilme, com a produção de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (polissacarídeos), proteínas e ácidos nucleicos. (Lado & Yousef, 2007).

2.2.4. Medidas de controlo

As medidas de prevenção e controlo existentes são eficazes quando adoptadas de forma sistemática, como documentado em França e nos EUA (Estados Unidos da América), onde a incidência foi reduzida nas ultimas décadas devido ao aumento da actividade regulatória, implementação de programas de auto-controlo baseados nos princípios HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) ao longo da cadeia industrial e recomendações específicas para os grupos de alto risco (Valk et al., 2005).

Um plano de auto-controlo, baseado nos princípios HACCP - Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos - é um método sistemático que identifica os perigos associados ao manuseamento de cada alimento e as medidas adequadas para o seu controlo. Este sistema de auto-controlo é uma ferramenta de análise e prevenção de perigos ligados ao processamento alimentar e não deve ser encarada apenas para o controlo do produto final (Codex Alimentarius, 1997).

A existência de poucos registos de surtos de doenças transmitidas por alimentos com proveniência em indústrias onde é aplicado correctamente um sistema HACCP, demonstra o potencial deste sistema para prevenir surtos. Nos poucos surtos que têm sido relatados na literatura, envolvendo indústrias que implementaram este sistema de auto-controlo, foram detectadas falhas graves no fluxograma ou na execução do programa, reflectindo falta de compreensão deste ou de compromisso na sua aplicação (Motarjemi & Käferstein, 1999).

O surto de listeriose que ocorreu em 1993, em França, provocado pelo consumo de *rillettes* (paté de porco), ocorreu provavelmente por contaminação cruzada com carne crua, resultado de um processo de desinfecção das instalações e da linha de produção curto, portanto, ineficiente. A indústria responsável implementou o sistema HACCP após o surto e, entre outras medidas, alterou o fluxograma do processo de modo a minimizar o risco de contaminação cruzada entre as matérias-primas e o produto final (Goulet et al., 1998; Motarjemi & Käferstein, 1999).

Para controlar efectivamente *Listeria* spp. é importante rever e adaptar o fluxograma das instalações de modo a identificar os pontos críticos de controlo. Nos alimentos como o leite e lacticínios, que sofrem pasteurização, as áreas pós-pasteurização devem ser revistas com especial atenção. Nestes alimentos, que normalmente sofrem contaminação após tratamento térmico, é essencial controlar a *Listeria* no ambiente da unidade e nos equipamentos, cumprindo a limpeza e desinfecção de modo a remover a bactéria dos “pontos-chave”. O processo de pasteurização em si deve ser verificado regularmente (Bell & Kyriakides, 2003).

Tendo em conta que alguns tipos de alimentos são particularmente associados com surtos de listeriose e fornecem um elevado risco para os grupos de consumidores susceptíveis, se não é possível reduzir o risco para um nível seguro é então importante informar esses consumidores em relação ao perigo inerente a esses produtos, de modo a serem evitados. No Reino Unido foi recomendado às grávidas que evitem queijos de pasta mole (Camembert, Brie) e patés e que cozinhem bem os alimentos (Bell & Kyriakides, 2003).

2.3. Listeriose - a doença

Listeriose é uma doença zoonótica originada por bactérias do género *Listeria*. A maioria dos casos ocorre por ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* e, apesar de haver casos descritos de infecção por *L. ivanovii* (WHO, 1988; Cummins, Fielding & McLauchlin, 1994), estes são muito raros. É uma das doenças bacterianas mais mortais, com taxas de fatalidade entre os 20-30% (McLauchlin, 1990; Schuchat, Swaminathan & Broome, 1991).

A listeriose humana apresenta uma sazonalidade marcada, ocorrendo mais casos no fim do Verão/Outono, em contraste com a sazonalidade da listeriose animal, que apresenta um pico na Primavera (Liu, 2008).

2.3.1. Transmissão

As várias espécies de *Listeria* apresentam uma distribuição ambiental generalizada, desde o solo, vegetação em decomposição, lamas, águas fluviais, esgoto e ração animal. O seu reservatório natural é o meio ambiente (Rocourt & Seeliger, 1985) mas também funcionam como reservatórios animais domésticos e selvagens (EFSA, 2011). *L. monocytogenes* foi isolada de humanos adultos saudáveis, assim como de indivíduos em contacto com pacientes infectados (Schuchat et al., 1991).

A principal via de transmissão da listeriose são os alimentos contaminados, seja em casos esporádicos ou em surtos (WHO, 1988; Mead et al., 2006). No entanto, foram reportados casos de doença em pessoas que contactaram directamente com animais infectados, manifestando-se como infecção cutânea (Owen, Meis, Jackson, & Stoenner, 1960; McLauchlin & Low, 1994). Também foi demonstrada a via de transmissão nosocomial através da contaminação cruzada no período neonatal. McLauchlin (1996) reportou 29 casos de listeriose em recém-nascidos no Reino Unido e 22 noutros países que nasceram aparentemente saudáveis e desenvolveram a doença após partilharem a enfermaria, os materiais e serem manipulados pelas mesmas enfermeiras. Em oito casos que ocorreram no mesmo hospital e na mesma altura, foi identificado o óleo mineral como sendo a fonte (Schuchat et al., 1991). Durante o parto, seja de humanos ou de outros animais, o elevado

número de microrganismos presentes no aparelho genital materno ou nos instrumentos (contaminados durante o parto), leva à transmissão ao recém-nascido (McLauchlin, 1996).

Alguns estudos referem que a exposição oral dos animais (bovinos) a alimentos contaminados pode levar ao desenvolvimento de mastites e posteriormente haver a contaminação do leite, com alterações organolépticas mínimas (Fedio, Schoonderwoerd, Shute & Jackson, 1990; Schoder et al., 2011). Existe uma correlação entre a prevalência de *L. monocytogenes* no animal e no ambiente de processamento do leite e o manejo alimentar à base de silagem. O isolamento de *L. monocytogenes* foi 3 a 7 vezes mais provável em explorações que forneceram silagem durante todo o ano do que em explorações que não o fazem (Schoder et al., 2011). Podem igualmente ocorrer infecções mamárias através da penetração de *Listeria* no teto do úbere (Bourry, Poutrel & Roucort, 1995). Com excepção das mastites, os animais infectados por *Listeria* são raramente a forma de entrada da bactéria na cadeia alimentar pois normalmente os animais são excluídos desta após o diagnóstico de doença (Liu, 2008).

2.3.2. Listeriose humana

2.3.2.1. Epidemiologia

O padrão epidemiológico da listeriose baseia-se em casos esporádicos da doença com surtos ocasionais (Rocourt et al., 2000). Apesar do carácter ubiquitário da *L. monocytogenes*, a incidência de listeriose é muito baixa, normalmente com 2 a 8 casos anuais por milhão na Europa e Estados Unidos da América (Farber & Peterkin, 1991; Vázquez-Boland et al., 2001). Foram reportadas taxas excepcionalmente superiores em Espanha no ano de 1990 com 10,9 casos por milhão (Nolla-Salas et al., 1993) e em França, em 1986, com 14,7 casos por milhão (Goulet & Brohier, 1989). No Japão foi reportada uma incidência de 0,65 casos por milhão entre 1996 e 2002 (Okutani, Okada, Yamamoto & Igimi, 2004). Em situações epidémicas, a incidência na população-alvo aumenta num factor de 3 a 10 (Vázquez-Boland et al., 2001).

Em 2009, foram reportados pelos 26 Estados-Membros Europeus 1645 casos humanos de listeriose, representando um aumento de 264 casos (19%), em relação a 2008. Foram registadas 270 vítimas mortais representando uma taxa de fatalidade de 16,6% (EFSA, 2011).

A listeriose apresenta uma das maiores taxas de hospitalização, cerca de 90% (Mead et al., 1999) e de fatalidade (20-30%) (Goulet & Brohier, 1989; Farber & Peterkin 1991; Rocourt et al., 2000; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Esta última pode ser superior nos grupos de

risco como imunodeprimidos, idosos e pacientes com infecções do sistema nervoso central, podendo chegar aos 70% (Rocourt et al., 2000; Kuhn, Scotti & Vázquez-Boland, 2008).

Todos os 13 serótipos de *L. monocytogenes* podem levar ao desenvolvimento de listeriose em humanos mas o 1/2a, 1/2b, 3a e 4b são os identificados na maioria dos casos. Um estudo realizado por Leite et al. (2006), em Portugal, com 15 isolados clínicos demonstrou que 13 pertenciam ao serótipo 4b (86,7%) e 2 ao serótipo 1/2b (13,3%), o que está de acordo com outros estudos. Em França foram analisadas 603 amostras de *L. monocytogenes* provenientes de isolados humanos, entre os anos de 2001 e 2003, e 96% pertenceram aos serótipos 4b, 1/2a e 1/2b (Goulet et al., 2006). A maioria dos surtos são causados pelo serótipo 4b (como se pode verificar no Anexo II).

O período de incubação desde a exposição até ao aparecimento de sintomatologia é muito variável, podendo ocorrer de 1-70 dias (Schuchat et al., 1991; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

A listeriose é reportada essencialmente em países industrializados, havendo poucos ou nenhum caso reportado de África, Ásia e América do Sul. Isto tanto pode reflectir diferentes padrões de consumo ou hábitos alimentares, diferente susceptibilidade dos hospedeiros, falta de meios de diagnóstico (Rocourt et al., 2000) ou mesmo por falta de informação, por não haver sistemas de vigilância montados.

Valk et al. (2005) estudaram os sistemas de vigilância na Europa, abrangendo 17 países. Todos excepto Portugal tinham activo, pelo menos, um sistema de vigilância (Áustria, Bélgica, Islândia, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália, Holanda, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça e Reino Unido). A notificação de listeriose em humanos é obrigatória na maioria dos Estados Membros (excepto Bélgica, Holanda, Espanha, Reino Unido onde a notificação é voluntária), Islândia, Liechtenstein, Noruega e Suíça. Em Portugal não é uma doença de notificação obrigatória (EFSA, 2011).

Apesar de muito se ter compreendido nos últimos anos sobre a listeriose devido à ocorrência de surtos, a maioria dos casos de listeriose humana ocorrem esporadicamente. Um estudo realizado por Schuchat et al. (1992) concluiu que 32% dos casos esporádicos podiam ser atribuídos ao consumo de queijo de pasta mole ou de produtos de charcutaria. O número de casos esporádicos é difícil de estimar mas pensa-se ser muito superior ao reportado; Mead et al. (1999) afirmaram que o número real de casos de listeriose equivale a duas vezes o número de casos reportados.

Desde os anos 80 que foram identificados vários surtos, sendo confirmada que a fonte de transmissão, à semelhança nos casos esporádicos, foram alimentos contaminados. Em

1979, ocorreu um surto de listeriose em Massachusetts (EUA) associado ao serótipo 4b com 20 casos; no entanto este só foi reportado uns anos mais tarde. Estudos desenvolvidos tentaram descobrir a fonte e identificaram três possíveis alimentos (atum, salada de frango e queijo) que tinham em comum terem sido servidos juntamente com vegetais crus, provavelmente contaminados. Os vegetais não foram testados pelo que a fonte não foi confirmada (Ho, Shands, Friedland, Eckind & Fraser, 1986; Farber & Peterkin, 1991). O primeiro surto em que foi confirmado o alimento que o causou ocorreu em 1981 em Nova Escócia, Canadá e envolveu 41 casos (34 casos de perinatalidade [grávidas que sofreram abortos, nados mortos ou fetos que nasceram infectados] e 7 adultos). No decorrer deste surto foi desenvolvido um estudo epidemiológico de referência que permitiu identificar-se a fonte, uma salada coleslaw (Faber & Peterkin, 1991).

O leite e os laticínios têm sido referenciados várias vezes como a fonte de surtos. Lundén, Tolvanen & Korkeala (2004) afirmaram que os laticínios têm sido associados a aproximadamente metade dos surtos na Europa. Em 1983, também foi leite pasteurizado contaminado que provocou 49 casos de listeriose no estado de Massachusetts (EUA). Este surto levantou várias questões quanto à eficácia da pasteurização na inativação da *L. monocytogenes* no leite pois este provinha duma quinta com animais infectados. Foi isolada *L. monocytogenes* do leite cru e não foi encontrada qualquer falha no processo de pasteurização. Isto levou à hipótese de que a carga anormalmente elevada de bactérias no leite cru pode ter “sobrecarregado” o processo ou de que a localização das bactérias de *L. monocytogenes* no interior das células bovinas pode tê-las protegido da inativação pelo calor (Fleming et al., 1985; Farber & Peterkin, 1991). No entanto, estudos posteriores revelaram a eficiência da pasteurização do leite (71,7°C durante 15 s) (Bunning, Crawford, Tierney, & Peeler, 1992).

Em 1985, também nos EUA (Califórnia), queijo fresco mexicano infectou 142 pessoas e vitimou mortalmente 48 (Linnan et al., 1988). A contaminação do leite não foi eliminada devido a uma inadequada pasteurização ou pela mistura de leite cru com leite pasteurizado (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Na Suíça, entre os anos de 1983-1987, 122 pessoas ficaram infectadas após ingerirem queijo de pasta mole contaminado (Büla, Bille & Glauser, 1995). Inicialmente não se conseguia identificar a fonte de infecção mas, após uma extensa pesquisa nos produtos lácteos, isolou-se o mesmo subtipo na superfície do queijo em questão (Farber & Peterkin, 1991).

Além dos referidos, em 1995, em França, ocorreu um surto associado a queijo de pasta mole produzido com leite não pasteurizado (Lundén et al., 2004), em 2000 (Carolina do Norte) ligado a queijo fresco mexicano (MacDonald et al., 2005), em 2001 (Suécia)

associado a queijo fresco produzido a partir de leite cru (Carrique-Mas et al., 2003), em 2002 (Canadá) associado a queijo de pasta mole ou semi-dura de leite cru (Gaulin, Ramsay, Ringuette & Ismaïl, 2003), em 2003 (Texas) devido a queijo fresco mexicano (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007), em 2005 e 2006, na Suíça e República Checa, respectivamente, associados a queijo de pasta mole (Bille et al., 2006; Vít et al., 2007) e em 2008, (Canadá) devido a queijo produzido com leite cru (Taillefer, Boucher, Laferrière & Morin, 2010; Health Canada, 2009). Estes exemplos demonstram o risco elevado inerente ao consumo de leite cru ou de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Lundén et al., 2004).

Entre 1998 e 1999, ocorreu um surto incomum na Finlândia originado pela primeira vez pelo serótipo 3a e por manteiga, um alimento que raramente é veículo de *L. monocytogenes* (Lyytikäinen et al., 2000). A bactéria já tinha sido isolada também neste produto (para além do queijo) no surto referido anteriormente que decorreu na Suíça em 2005 (Bille et al., 2006).

Os produtos de charcutaria também foram referenciados como a causa de alguns grandes surtos: entre 1987 e 1989, no Reino Unido, mais de 300 pessoas foram infectadas devido ao consumo de paté contaminado (McLauchlin, Hall, Velani & Gilbert, 1991), em França (1992) foram registados 279 casos e 85 mortos pelo consumo de língua de porco em gelatina (Jacquet et al., 1995) e no ano seguinte 38 casos devido ao consumo de “rilletes” (paté de porco) (Goulet et al., 1998). Nos Estados Unidos (1998-1999) um surto com origem em salsichas Frankfurt afectou 108 pessoas (Graves et al., 2005; Mead et al., 2006) e, recentemente, no Canadá (2008) 58 pessoas ficaram infectadas por consumirem carne contaminada (pronto-a-comer) (Health Canada, 2009; Taillefer et al., 2010).

Existem outros alimentos referidos como fonte de surtos, tais como peixe e marisco, fruta e vegetais e comida preparada pronta a comer (sandesh e salada) (Health Canada, 2010).

Recentemente (entre Setembro e Dezembro de 2011) ocorreu um surto de grandes dimensões nos Estados Unidos. Este afectou 146 pessoas e vitimou mortalmente 25; foram indicadas 4 estirpes diferentes de *Listeria monocytogenes* que contaminaram meloas numa quinta no estado de Colorado (CDC, 2011).

A FDA identificou os factores que provavelmente contribuíram para a introdução, disseminação e crescimento de *L. monocytogenes* nas meloas. A introdução do agente na quinta em questão pode ter decorrido da contaminação esporádica dos campos de cultivo e posteriormente introduzido nas instalações de embalagem, como pode ter decorrido da contaminação do camião, utilizado para transportar meloas a uma exploração de gado, pois o veículo ficava estacionado junto às instalações de embalagem.

A disseminação da bactéria pode ter ocorrido devido ao design da embalagem pois a água escorria para o chão, nas zonas de passagens de empregados e equipamentos, pode ter corrido devido à dificuldade em higienizar o chão da zona de embalamento, assim como pode dever-se à má higienização e desinfecção das embalagens de transporte, após a sua utilização noutros produtos agrícolas. A ausência do passo de pré-arrefecimento após a colheita e antes do armazenamento no frio pode ter levado ao crescimento de *Listeria monocytogenes*. À medida que as meloas arrefeciam pode ter ocorrido condensação que promoveu a multiplicação da bactéria (CDC, 2011).

2.3.2.2. Factores predisponentes

O desenvolvimento da doença depende de 3 factores: número de bactérias ingeridas, as propriedades patogénicas da estirpe e o estado imunitário do hospedeiro.

É difícil determinar a dose mínima de *Listeria monocytogenes* capaz de provocar doença nos humanos. Esta é influenciada por uma variedade de factores, tais como o estado imunitário do doente, a quantidade de alimento ingerido ou a virulência da estirpe. Além do referido, o tempo decorrido entre a ingestão do alimento contaminado e o aparecimento de sintomas, assim como o diagnóstico, pode levar a uma contínua multiplicação ou à morte de bactérias no alimento. A dose infectante ainda não foi determinada em humanos mas o número de bactérias detectadas nos alimentos, responsáveis por surtos e por casos esporádicos, sugerem que este seja cerca de 10^6 células por grama. No entanto não podem ser excluídas doses mais baixas, pelo menos em imunodeprimidos, idosos e grávidas (Vázquez-Boland et al., 2001; Wagner & McLauchlin, 2008).

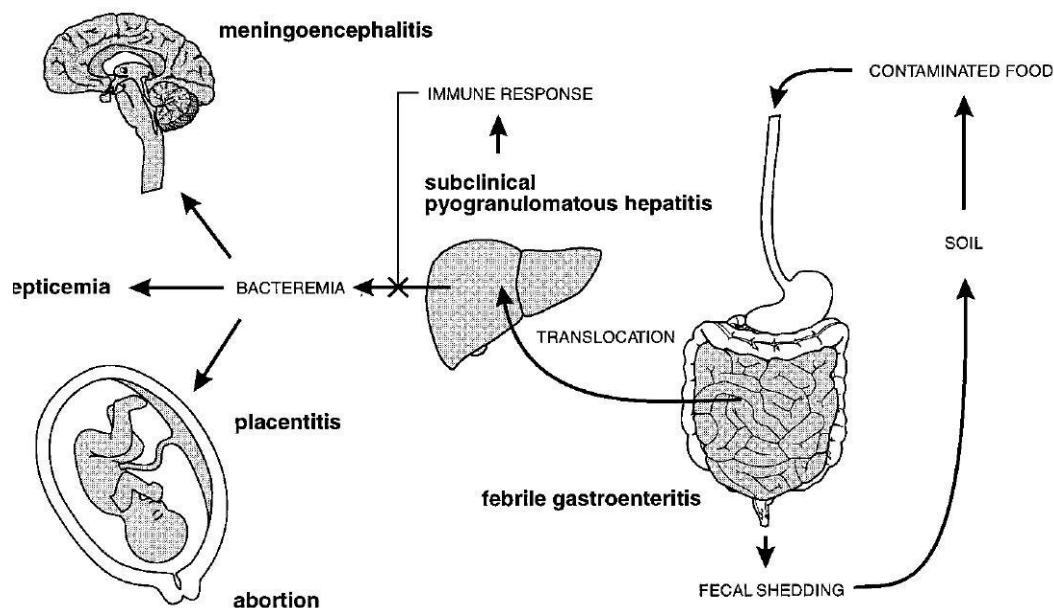
A susceptibilidade do hospedeiro é da maior importância no desenvolvimento de sinais clínicos (Rocourt, 1996). A maioria dos pacientes apresenta uma alteração fisiológica ou patológica que afecta as células T do sistema imunitário, daí a listeriose humana ocorrer mais frequentemente em grupos de risco específico, que incluem grávidas, idosos, recém-nascidos e adultos imunodeprimidos (infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana [VIH], por exemplo). A listeriose em indivíduos adultos está associada, na maioria dos casos (mais de 75%), a pelo menos uma das seguintes condições: malignidade (leucemia, linfoma ou sarcoma), quimioterapia, terapêutica imunossupressiva (corticosteróides), patologia hepática crónica (cirrose ou alcoolismo), patologia renal, diabetes ou doença imuno-mediada (lúpus) (McLauchlin, 1990; Farber & Peterkin, 1991; Schuchat et al., 1991; Rocourt, 1996). Também são predispostos pacientes sujeitos a uma terapêutica com cimetidina (antagonista dos receptores H₂ do estômago que aumentam o pH gástrico) (Ho et al., 1986). No entanto, adultos saudáveis podem ocasionalmente contrair a doença (Rocourt et al., 1993).

2.3.2.3. Fisiopatogenia

Após a entrada da bactéria no estômago, esta sofre uma primeira barreira de defesa composta pelo ambiente ácido. Como referido anteriormente, uma terapêutica com anti-ácidos predispõe a infecção, o que indica que o ambiente hostil do estômago pode levar a uma destruição significativa de *Listeria*. O ponto de entrada da bactéria é controverso, alguns estudos realizados em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) indicam que esta penetra no hospedeiro pelas células epiteliais através de macrófagos (Racz, Tenner & Mero, 1972) enquanto outros estudos realizados em ratos sugerem que há colonização das placas de Payer pela *Listeria*, utilizando as células M do epitélio. Neste último, foi demonstrado que a translocação da *Listeria* patogénica ocorre sem provocar lesões nos intestinos dos ratos, sugerindo que não é necessária uma fase epitelial com multiplicação bacteriana para ocorrer infecção sistémica (Marco et al., 1992). Esta teoria foi apoiada pelo estudo realizado por Pron et al. (1998), em ratos, no qual foi sugerido que o principal local de replicação da bactéria são as placas de Peyer e que o factor de virulência Hly (hemolisina) é indispensável para este processo. Mas fica por explicar a enterite que pode ocorrer no decorrer de listeriose. O estudo realizado por Racz et al. (1972) sustenta a existência de sintomas gastro-intestinais e febre com a invasão intestinal demonstrada em porquinhos-da-índia (cobaias).

As bactérias que atravessam a barreira intestinal são transportadas por macrófagos pela via linfática ou sanguínea para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado (Marco et al., 1992). Os macrófagos destroem a maioria das bactérias mas as restantes multiplicam-se, principalmente nos hepatócitos (Conlan & North, 1992; Cousens & Wing, 2000). Nestes, vários mecanismos imunológicos, principalmente por parte dos linfócitos T, são activados levando a uma eliminação completa de *Listeria* do organismo, se o indivíduo for imunocompetente. No caso de a infecção não ser controlada ocorre uma proliferação contínua bacteriana no parênquima hepático, levando à libertação de bactérias para a corrente sanguínea - bacteriémia. *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica capaz de colonizar variados tecidos, como indica a sua capacidade de provocar septicémia. No entanto, as principais formas de listeriose (meningoencefalite e aborto) reflectem o tropismo para as células do sistema nervoso e da placenta (Figura 4) (Vazquez-Boland et al., 2001).

Figura 4 - Fisiopatologia da infecção por *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001)



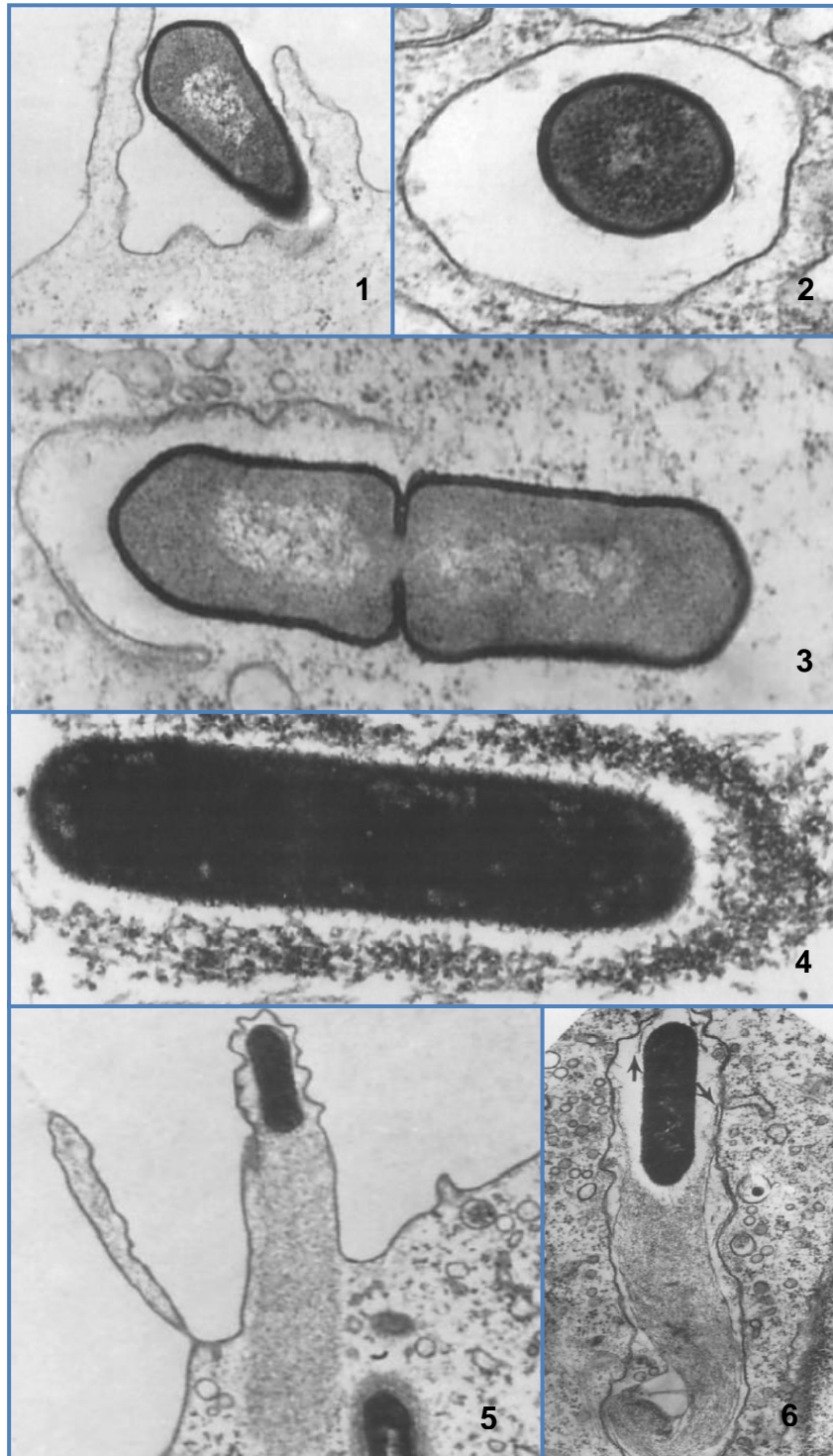
Em indivíduos imunocompetentes sem qualquer condição predisponente, a ingestão de uma quantidade pequena de *L. monocytogenes* provavelmente só levará ao desenvolvimento de imunidade. Por outro lado, uma ingestão de elevadas quantidades é provável que leve ao desenvolvimento de um episódio de gastroenterite e febre e, dependendo da virulência da estirpe, a uma situação invasiva. Indivíduos imunodeprimidos não conseguem estabelecer uma resposta imunitária adequada e suficiente para controlar a multiplicação hepática, levando a uma susceptibilidade para invasão de outros tecidos através da corrente sanguínea, no caso de ingestão de inóculo, mesmo em doses baixas (Vázquez-Boland et al., 2001).

Como referido anteriormente, *L. monocytogenes* tem a capacidade de invadir variados tipos de células, tais como células epiteliais, hepatócitos, células endoteliais e células nervosas. Tanto em macrófagos como em células não fagocitárias, o ciclo de infecção intracelular desenvolvido apresenta características semelhantes.

O ciclo (Figura 5) inicia-se com uma adesão à superfície (1) e penetração na célula hospedeira. A bactéria gradualmente “afunda-se” na superfície da célula e a membrana celular rodeia-a, formando um vacúolo fagocítico (2). A bactéria *L. monocytogenes* rompe a membrana do vacúolo (Gaillard, Berche, Mounier, Richard & Sansonetti, 1987) ficando livre no citosol, onde se multiplica, (3) e é envolvida por filamentos de actina (4). Estes filamentos formam uma cauda de actina com mais de 40 µm de comprimento num pólo que impulsiona a bactéria no citoplasma em direcção à membrana celular (5), a uma velocidade de 0,3

$\mu\text{m/s}$. Em contacto com a membrana celular é formada uma protusão com a bactéria na ponta e esta penetra na célula vizinha levando à formação de um fagossoma secundário com dupla membrana (6). A bactéria dissolve a dupla membrana e atinge o citoplasma, iniciando-se nova proliferação e difusão célula-a-célula (Tilney & Portnoy, 1989; Vázquez-Boland et al., 2001).

Figura 5 - Imagens ao microscópio óptico que demonstram a invasão celular e a difusão célula-a-célula (Vazqu  ez-Boland et al., 2001)



2.3.2.4. Factores de virulência

Existem várias proteínas responsáveis pela patogénese da *L. monocytogenes*. Algumas são responsáveis pela adesão e invasão à célula hospedeira, como a Internalina A (InIA) e a Internalina B (InIB) e outras pelo ciclo de infecção intracelular, tais como a listeriolisina O (LLO), fosfolipase C e ActA (Figura 6) (Kuhn et al., 2008).

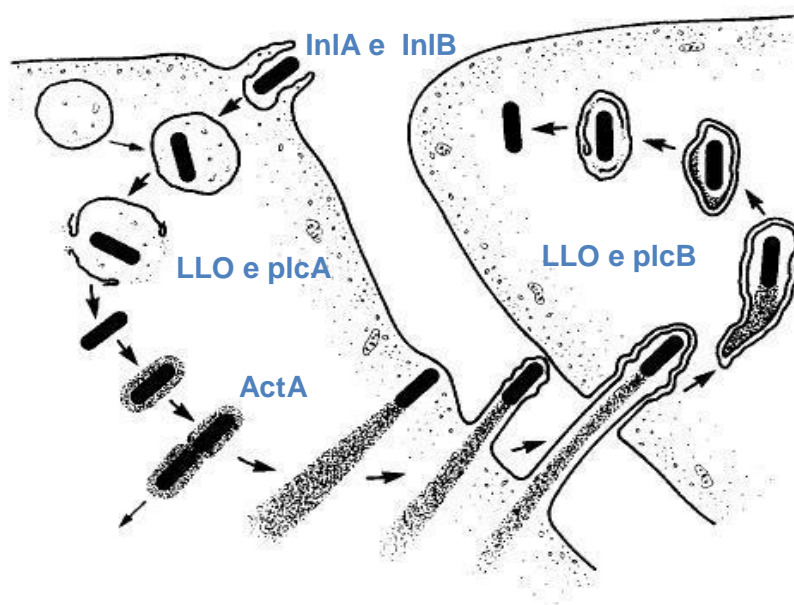
A Internalina A é uma proteína com 800 aminoácidos que promove a entrada nas células hospedeiras quando se liga ao receptor de caderina-E. Esta glicoproteína transmembranar está presente nas células epiteliais. A Internalina B, por seu lado, é composta por 630 aminoácidos e reconhece os receptores de diferentes tipos de células, levando à internalização em hepatócitos, fibroblastos e células não epiteliais (Cossart, Pizarro-Cerdá & Lecuit, 2003).

A listeriolisina O é uma enzima codificada pelo gene *hly* e foi primeiro factor de virulência a ser descoberto. É uma toxina que ajuda a bactéria a “escapar” da célula hospedeira. Dentro dos fagossomas o pH é mais ácido o que estimula a libertação da listeriolisina O, esta forma poros que levam ao rompimento do vacúolo, sendo assim responsável pela lise deste (Vázquez-Boland et al., 2001). Esta proteína é particularmente importante na virulência pois estirpes que se encontram mutadas no gene *hly* são avirulentas (Kuhn et al., 2008).

LLO necessita de duas fosfolipases C (igualmente secretadas por *L. monocytogenes*) para efectuar a lise dos vacúolos primário e secundário intracelulares. Sendo estas a fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC), codificado pelo gene *plcA* e a fosfolipase C fosfatidilcolina (PC-PLC), codificado pelo gene *plcB*. Para ocorrer a activação da PC-PLC é necessário outro factor de virulência, a metaloprotease (Mpl) que é codificada pelo gene *mpl* (Vázquez-Boland et al., 2001).

A ActA é uma proteína com 639 aminoácidos que induz a polimerização dos filamentos de actina promovendo o movimento da bactéria no citoplasma de célula hospedeira e a difusão célula-a-célula (Vázquez-Boland et al., 2001).

Figura 6 - Invasão celular, difusão célula-a-célula e factores de virulência responsáveis
(Vazquez-Boland et al., 2001)



2.3.2.5. Formas clínicas e Sintomas

A listeriose pode ocorrer como infecção generalizada, com septicemia, ou como uma infecção localizada num sistema/órgão específico e podem ser definidas duas formas da doença, de acordo com a idade do hospedeiro: maternofetal/neonatal (período perinatal) ou listeriose em adultos. (Schuchat et al., 1991; Lorber, 1997; Vázquez-Boland et al., 2001). Em adultos esta pode ser distinguida de uma forma invasiva (bacteriemia) ou não invasiva (gastrointestinal).

Como no decorrer da gestação a imunidade mediada por células é prejudicada, as mulheres grávidas estão predispostas a esta infecção, na forma maternofetal/neonatal (Weinberg, 1984; Doganay, 2003). Pensa-se que a infecção resulte da disseminação hemática das bactérias, alojamento na placenta e, posteriormente, invasão do feto. Consequentemente ocorre aborto, geralmente no decorrer do último terço de gestação, nascimento de um nado morto ou o nascimento de um bebé com septicemia, meningite ou pneumonia, na maioria das vezes fatal. Esta infecção normalmente não acarreta sintomas para a mãe, excepto ligeiros sintomas gripais nos 15 dias anteriores ao aborto (Vázquez-Boland et al., 2001; Janakiraman, 2008).

Infecção neonatal também tem sido descrita, ocorrendo 5 a 7 dias após o parto. O bebé nasce saudável e de uma gravidez sem complicações mas desenvolve uma meningite. A fonte do agente é desconhecida (Janakiraman, 2008).

Listeriose em adultos (não gestantes) é tipicamente associada (50-70% dos casos) ao sistema nervoso central (SNC) apresentando, na maioria das vezes, meningoencefalite ou meningite (Vázquez-Boland et al., 2001) e mais raramente abscessos cerebrais (Dee & Lorber, 1986; Cone et al., 2003) e na medula espinhal (Morrison, Brown & Goodling, 1980; Khan, Pao & Kendler, 2001). Os sintomas mais comuns associados à infecção no SNC são: febre, ataxia, convulsões, alteração do estado mental e perda de consciência (Schuchat et al., 1991).

Infecções por *L. monocytogenes* podem igualmente localizar-se no sistema cardiovascular, apresentando endocardite (Bassan, 1975; Gallagher & Watanakunakorn, 1988; Guerrero et al., 2004; Makaryus et al., 2004), miocardite (Doganay, 2003) ou infecção arterial (Navarro-Martínez, Gómez-Merino, Gómez-Garrido & Fernández-Fúnez, 2001), no sistema respiratório com pleurite (Mazzulli & Salit, 1991) ou pneumonia (Doganay, 2003), no sistema nervoso exibindo abscessos cerebrais (Garrido, Martínez-Yélamos, Murillo & Viladrich, 2010), no sistema músculo esquelético manifestando artrite (Doganay, 2003; Handrick, Schwede, Tomalik & Berthold, 2008) ou osteomielite (Chirgwin & Gleich, 1989; Khan, 2001; Doganay, 2003), no sistema oftálmico com endoftalmite (Ballen, Loffredo & Painter, 1979) ou conjuntivite (Busch, 1971) e como infecção cutânea (Owen et al., 1960; McLauchlin & Low, 1994). Outros órgãos reportados como locais de infecção são o peritoneu (peritonite), os linfonodos (linfadenite), o fígado (hepatite e abscesso hepático), a vesícula biliar (colecistite) e o baço (abscesso esplênico) (Doganay, 2003). Normalmente estas patologias estão associadas a indivíduos susceptíveis, como já referido. Em adultos saudáveis a infecção por *L. monocytogenes* é associada a uma gastroenterite aguda e auto-limitante caracterizada por febre, diarreia não sanguinolenta, vômitos e dor de cabeça. Vários surtos de gastroenterite febril reportados têm sido associados a *L. monocytogenes*, estes apresentam tipicamente um período de incubação de 24 horas e os sintomas cessam ao fim de 2 dias (Ooi & Lorber, 2005).

2.3.2.6. Diagnóstico

O diagnóstico de listeriose é positivo quando o agente é isolado a partir de uma amostra de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) (Schuchat et al., 1991), líquido amniótico (Janakiraman, 2008), placenta, mecónio, lóquia, líquido proveniente de lavagem gástrica ou zaragatoa do ouvido de recém-nascidos, directamente semeada numa placa de agar (contendo sangue) e incubada a 35°C. Este também pode ser efectuado a partir de uma cultura de fezes recorrendo primeiro a um enriquecimento selectivo para *Listeria* e depois a meio selectivo (Allerberger & Wagner, 2010).

2.3.2.7. Tratamento

Apesar de quase todas as estirpes de *Listeria* serem susceptíveis à maioria dos antibióticos, a taxa de cura é apenas de 70%. A escolha de eleição é a combinação de uma aminopenicilina (amoxicilina ou ampicilina) mais um aminoglicosídeo (gentamicina) (Hof, 2004). Para evitar recaídas a antibioterapia deve ser prolongada, 2 a 3 semanas para neonatos, 2 a 4 semanas para adultos imunodeprimidos com meningite e bacteriémia e ainda superior para casos complicados, tais como endocardite (Painter & Slutsker, 2007). Todas as estirpes de *L. monocytogenes* são resistentes às cefalosporinas (Schlech, 2000).

2.3.2.8. Prevenção

Sendo a listeriose humana uma zoonose em que a principal fonte de transmissão são os alimentos contaminados, o passo mais importante para prevenir a doença consiste na redução e eliminação de *Listeria* dos produtos alimentares. A ampla distribuição de *Listeria* no ambiente facilita a sua entrada em fábricas e matadouros e as suas características (multiplicação a temperaturas de refrigeração, produção de biofilmes) ajudam a que esta consiga subsistir nas instalações por longos períodos de tempo. Assim, a sua introdução é inevitável mas a contaminação dos alimentos pode ser reduzida através de uma higiene meticulosa (Schlech, 2000). Para eliminar os agentes bacterianos da cadeia é fundamental a introdução de passos fundamentados nas unidades fabris, assim como a respectiva monitorização. Deve ser dada especial atenção à formação dos trabalhadores. Estes, além de serem potenciais fontes de entrada de microrganismos para as instalações, podem igualmente ser responsáveis pela contaminação cruzada, quando são negligenciadas as regras básicas de manipulação dos alimentos.

A educação dos consumidores é de extrema importância para a prevenção da listeriose, principalmente dos grupos de risco. Um adequado processamento térmico dos alimentos, uma correcta armazenagem de produtos refrigerados (< 4°C), uma limpeza regular dos frigoríficos e o consumo de alimentos “pronto para consumo” o mais rápido possível são algumas recomendações que devem ser fornecidas. A comunidade médica tem aqui um papel de relevância (Liu, 2008).

Um estudo desenvolvido em ratos por Liu, Lawrence, Pinchuk, Ainsworth & Austin (2007) demonstrou que uma estirpe naturalmente avirulenta de *L. monocytogenes* do serótipo 4b é capaz de provocar uma imunidade forte e duradoura. Mais pesquisas neste campo poderão ser úteis para o desenvolvimento de uma vacina que ajude a prevenir a listeriose, tanto em humanos como em animais e para explicar diferenças entre países em relação à ocorrência de casos clínicos.

2.3.3. Listeriose animal

A listeriose foi inicialmente descrita por Murray et al. (1926) como uma doença que afectava coelhos e durante anos foi considerada uma doença veterinária (Shuchat et al., 1991). A listeriose animal afecta tanto animais domésticos como selvagens e muitas vezes a infecção ocorre por ingestão de alimentos e água contaminados com as espécies patogénicas *Listeria monocytogenes* e *L. ivanovii* (Liu, 2008). Uma grande proporção de animais saudáveis é assintomática e funcionam como reservatórios de *L. monocytogenes*, contaminando o meio ambiente através das fezes. Mas, apesar da maioria das infecções serem subclínicas, a doença pode ocorrer esporadicamente ou em surtos (Wesley, 2007; EFSA, 2011). A maioria das infecções animais correspondem aos serótipos 1/2a, 1/2b e 4b, no entanto podem igualmente ser causados por 4a e 4c, serótipos raramente isolados a partir de casos humanos (Cheng, Siletsky & Kathariou, 2008).

Como a listeriose não é uma doença de notificação obrigatória, a incidência exacta nos animais de produção é desconhecida. Segundo o relatório da EFSA (2011), em 2009, 8 Estados Membros e um estado não Membro (Noruega) reportaram vários casos de listeriose animal em várias espécies e com a maior positividade em ovinos, caprinos e bovinos.

Os factores que predis põem à doença nos animais incluem a altura do ano, o estado imunitário, a alimentação e o manejo dos animais (Wesley, 2007). A relação entre a silagem e o desenvolvimento de listeriose tem sido estudada e concluiu-se que uma silagem qualidade deficiente corresponde a um factor de risco no desenvolvimento de listeriose nos animais domésticos e para a contaminação no leite, particularmente nas últimas semanas de Inverno (Wagner & McLauchlin, 2008).

As manifestações clínicas e patológicas são muito semelhantes às dos humanos, indicando que os mecanismos de patogénese são independentes do hospedeiro (Kuhn et al., 2008). Nos animais domésticos, especialmente ovelhas e cabras, a sintomatologia inclui encefalite, aborto, mastite ou septicemia (EFSA, 2011).

A listeriose nas ovelhas é provocada pelos serótipos 1/2, 3 e 4 de *L. monocytogenes* e por *L. ivanovii* (Low & Linklater, 1985). Em 1929 Gill registou casos de doença em ovelhas na Nova Zelândia denominando-a de “circling disease”. Este nome deve-se à encefalite, encefalomielite e meningoencefalite (Wesley, 2007).

De modo a prevenir a listeriose animal deve-se garantir a qualidade e frescura da silagem e da água fornecida aos animais, assim como a limpeza regular das instalações onde estes se encontram. Os animais devem ser testados e, perante sintomatologia clínica e um diagnóstico positivo, estes devem ser separados dos restantes e tratados. Se forem

assintomáticos mas positivos a *L. monocytogenes* devem ser separados dos animais saudáveis (Liu, 2008). O futuro desenvolvimento e aplicação da vacina contra *L. monocytogenes*, já referido, será igualmente útil na prevenção da listeriose em animais (Liu et al., 2007).

2.4. Listeriose em Portugal

Em Portugal, a listeriose não é uma doença de notificação obrigatória nem tem um sistema de vigilância activo o que torna complicado compilar os dados relativos a esta doença. No entanto, alguns estudos têm ajudado a esclarecer a doença em Portugal.

Almeida, Gibbs, Hogg & Teixeira (2006) realizaram um estudo retrospectivo sobre a listeriose em Portugal e compilaram os casos identificados entre os anos de 1994 e 2003. Foram registados 35 casos de listeriose com uma taxa de fatalidade de 37,5%, para os 16 casos que se teve acesso à evolução clínica da doença. Segundo este estudo o ano com mais casos foi o de 2003, com uma incidência de pelo menos 1,4 casos por milhão de habitantes. Este valor representa apenas uma estimativa pois nem todas as unidades de saúde do país foram contactadas, a doença não apresenta sintomatologia característica, o que dificulta o diagnóstico, e não é obrigatório notificar os casos de listeriose às autoridades de saúde. No entanto este estudo permitiu ter a noção que, apesar de não haver registos em relatórios oficiais, a listeriose é uma ameaça em Portugal.

Os únicos dados oficiais referentes a Portugal são relativos a 2004, registados no relatório da EFSA/ECDC, reportando 38 humanos casos nesse ano (EFSA, 2007). Os dados anuais anteriores e posteriores a 2004 não são reportados por esta autoridade (EFSA, 2007; EFSA, 2011).

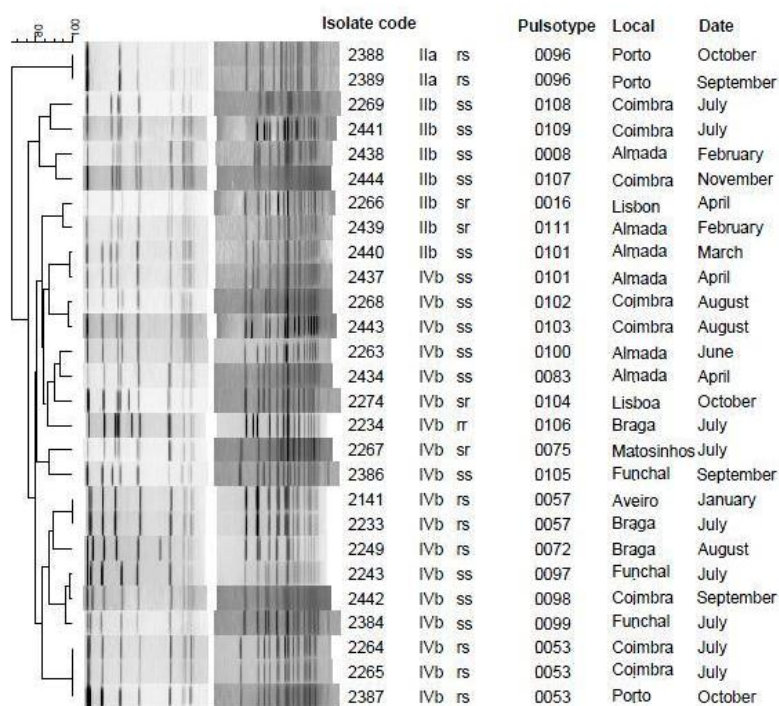
Almeida, Magalhães, Barbosa, Hogg & Teixeira (2009) compilaram casos de listeriose diagnosticados em Portugal entre 2004 e 2007. Foram identificados 67 casos com uma taxa de fatalidade superior a 40%, para os 24 casos em que foi conhecida a evolução clínica. O número de casos aumentou ao longo dos anos em estudo registando-se em 2007 24 casos, com uma taxa anual de 2,3 casos por milhão de habitantes, sensivelmente o dobro do valor referido em 2003.

Relativamente à presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, Mena et al. (2004) estudaram a sua incidência em produtos comercializados em Portugal (colhidos a nível do retalho) e de 1035 amostras, 72 (7,0%) apresentaram resultado positivo. As maiores taxas de positividade foram registadas em carne de frango cru (60%), carne vermelha crua (17,7%), leite cru (16,7%), peixe cru (12%), farinha (18,5%) e vegetais congelados (12,9%). Apesar dos valores serem elevados, a presença de *L. monocytogenes* nestes produtos não

é tão problemática quanto a presença em produtos “prontos para consumo” pois estes alimentos crus normalmente são cozinhados ou pasteurizados antes de consumidos. Nos produtos “prontos para consumo” foi registada uma incidência de 25% em fiambre, 8,3% em frutos secos, 4,1% em pastelaria e 4% em queijo fresco, alimentos que fazem parte dos hábitos alimentares Portugueses (Mena et al, 2004).

Com o objectivo de caracterizar isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de casos humanos, Magalhães, Barbosa, Santos, Almeida e Teixeira (2008) caracterizaram geneticamente, através da técnica de PFGE (usando as enzimas Ascl e Apal), 27 isolados. A análise da combinação das duas enzimas resultou num total de 22 pulsótipos, representados na Figura 7. Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de casos de Lisboa pertenciam aos pulsótipos 0016 e 0104 e os isolados de casos de Almada pertenciam aos pulsótipos 0008, 0083, 0100, 0101, 0104 e 0111.

Figura 7 - Caracterização genética por PFGE dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de casos humanos (Maqalhães et al., 2008)



2.5. Investigação de Surtos de Toxinfecção Alimentar

Os surtos de listeriose ou de outras infecções alimentares são investigados tanto para evitar a transmissão contínua da doença, como para evitar surtos semelhantes no futuro. Os objectivos específicos incluem o controlo do surto, detecção e remoção de alimentos implicados do mercado, identificação de factores de risco associados ao hospedeiro, ao agente e ao meio ambiente, identificação dos factores que contribuíram para a contaminação, sobrevivência, crescimento e disseminação do agente suspeito, prevenção de futuros surtos e fortalecimento de políticas de segurança alimentar, aquisição de dados epidemiológicos para avaliação do risco de agentes patogénicos de origem alimentar e estímulo à pesquisa que posteriormente vai ajudar na prevenção de surtos semelhantes (WHO, 2008).

No decorrer da investigação de um surto a velocidade é essencial mas obter a resposta certa é igualmente essencial (CDC, 2005) Assim, para satisfazer ambos os requisitos, a investigação pode ser composta com 3 fases, a investigação epidemiológica, a investigação ambiental e alimentar e a investigação laboratorial (WHO, 2008).

A investigação epidemiológica deve incluir a validação das informações obtidas até à data, a recolha de relatórios de testes de laboratório aplicáveis ao agente em questão, identificar os casos clínicos e recolher o máximo de informação disponível junto destes, assegurar a recolha de amostras clínicas apropriadas e amostras de alimentos (WHO, 2008).

A fase de investigação ambiental e alimentar deve ser conduzida em paralelo com a investigação epidemiológica e laboratorial de modo a se descobrir a causa e o modo como ocorreu o surto e, mais importante, para instituir medidas correctivas de modo a prevenir futuros surtos. A investigação ambiental e alimentar, perante um surto de uma toxinfecção alimentar, tem como objectivos identificar a origem, o modo e a extensão da contaminação, avaliar o potencial de crescimento do agente patogénico durante o processamento, manuseamento e armazenamento e identificar e implementar medidas correctivas. O processo de Investigação deve ser guiado pelo que já é conhecido relativamente às investigações epidemiológica e laboratorial. Se um alimento for indiciado epidemiologicamente deve-se pesquisar a sua contaminação e o modo como ela possa ocorrer, assim como, se as investigações laboratoriais identificam um agente patogénico, deve-se focar a investigação em alimentos e condições conhecidas e provavelmente associadas a ele. Todos os alimentos suspeitos que possam estar implicados no surto devem ser cuidadosamente investigados (WHO, 2008).

A investigação ao nível dos estabelecimentos alimentares requer que sejam colhidas informações e verificadas condições de modo a proceder a uma recolha de dados úteis no

processo de investigação, procedendo a entrevistas aos funcionários dos estabelecimentos de modo a avaliar se houve processamento ou preparação de alimentos suspeitos, revisões de registos de funcionários (para determinar se algum se encontrava doente no período de interesse), análises das condições gerais de higiene, avaliações específicas das fases de processamento de um alimento suspeito, amostras de alimentos e ambientais, revisões da saúde, alimentação e higiene dos trabalhadores, incluindo amostras para análise, avaliações do sistema de água e abastecimento, medição da actividade da água (aw), temperaturas e pH, com instrumentos apropriados (WHO, 2008).

Havendo um alimento suspeito deve ser investigado e revisto o seu processo de fabrico, incluindo ingredientes, as pessoas que o manipularam, os procedimentos e equipamentos utilizados, potenciais fontes de contaminação e condições de tempo e temperatura para o qual os alimentos foram expostos (WHO, 2008).

As medidas de controlo e de prevenção devem ser aplicadas o mais rápido possível. As medidas de controlo, que devem ser executadas assim que há o conhecimento do foco de um surto, devem ser focalizadas para determinados dos pontos na cadeia de infecção, o agente, a fonte ou o reservatório (CDC, 2005).

A investigação laboratorial inclui análises de amostras clínicas e de amostras alimentares. Em ambas deve-se respeitar os procedimentos de colheita de amostras, devem ser realizados os testes apropriados ao agente e ao tipo de amostra, assim como testes de caracterização; deve igualmente ser prestado apoio às investigações epidemiológicas e alimentar na detecção do agente patogénico (WHO, 2008).

3. Investigação do surto de listeriose e medidas aplicadas pela ASAE

3.1. Identificação do surto e metodologia da investigação

Em Julho de 2010 o laboratório da Escola Superior de Biotecnologia da Saúde da Universidade Católica Portuguesa (ESB- UCP), na sequência de um aumento de casos de listeriose registados na região de Lisboa e Vale do Tejo (15 casos entre os meses de Fevereiro a Julho de 2010) e do mesmo pulsótipo, informou a Direcção Geral de Saúde da possível existência de um surto de listeriose. O departamento de Saúde Pública (DSP) convocou os Delegados de Saúde dos Agrupamentos de Centros de Saúde (ACES) de residência dos casos, solicitando colaboração e realização de Inquéritos Epidemiológicos (Anexo III). As informações relevantes relativamente a nove doentes, nomeadamente os estabelecimentos de retalho em que teriam efectuado compras e os alimentos adquiridos e os estabelecimentos de restauração frequentados e respectivas refeições/alimentos, nos dois meses anteriores aos primeiros sintomas, foram encaminhadas para a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Em Agosto de 2010 surgiram as primeiras notícias referentes ao surto de listeriose (Figura 8).

Figura 8 - Notícia referente ao Surto de listeriose no dia 9 de Agosto de 2010, Diário de



A ASAE desenvolveu uma acção de 11 a 15 de Outubro de 2010 inspeccionando diversos estabelecimentos de retalho, referidos neste inquérito e outros em zonas geográficas próximas. Nesta Operação foram envolvidas oito brigadas de inspecção, duas brigadas de colheita de amostras e três elementos do GTP (Gabinete Técnico Pericial). Nestas visitas foram verificadas as condições higiénicas dos estabelecimentos, realizada a colheita de géneros alimentícios susceptíveis de poderem estar contaminados e efectuadas zaragatoas aos equipamentos e utensílios. Após o conhecimento dos resultados, foi efectuada uma 2ª acção entre 25 e 26 de Novembro nos estabelecimentos de retalho (envolvendo duas brigadas de inspecção, duas brigadas de colheita de amostras e um técnico do GTP) e entre Novembro e Fevereiro nos estabelecimentos de produção (envolvendo três brigadas especializadas - Direcção Regional do Norte, Direcção Regional Lisboa e Vale do Tejo e Direcção Regional do Alentejo e dois elementos do GTP). Esta 2ª acção de inspecção envolveu assim quer os estabelecimentos de retalho, quer os estabelecimentos que produziram géneros alimentícios (indústrias) com resultados não satisfatórios. Após estas duas Operações foi ainda realizada uma segunda inspecção a uma das indústrias de lacticínios com resultados não conformes realizada pela brigada especializada da Direcção Regional do Alentejo. As brigadas de inspecção e especializadas são compostas por inspectores com formação específica em fiscalização e inspecção.

3.2. Amostras

Para a colheita de amostras foram referenciados produtos não embalados como o queijo fresco e produtos de charcutaria fatiados no momento da venda (fiambre, chouriço, chourição, mortadela, presunto e outros) e, nas grandes e médias superfícies, refeições prontas para consumo disponibilizadas em expositores. As colheitas foram efectuadas assepticamente para sacos esterilizados, de acordo com os procedimentos descritos no Plano de Colheita de Amostras “análise microbiológica dos géneros alimentícios” (ASAE, comunicação pessoal, 2011) sendo cada amostra constituída por cinco subunidades, cada uma com o peso aproximado de 100 g. As amostras foram analisadas no laboratório de Segurança Alimentar da ASAE segundo a ISO 11290, como recomendado no Regulamento (CE) nº 2073/2005. As amostras com resultados positivos (contagem ou pesquisa de *Listeria monocytogenes*) foram posteriormente enviadas para serotipificação e determinação do pulsótipo através de PFGE, análises efectuadas no laboratório da ESB- UCP. Como referido anteriormente, segundo o Regulamento (CE) nº 2073/2005, a nível de produtos colhidos no retalho, a *L. monocytogenes* não deve estar presente acima das 100 ufc/g durante o seu período de vida útil comercial. No entanto, as amostras colhidas nos estabelecimentos de retalho foram igualmente analisadas para o critério pesquisa de *Listeria monocytogenes* em

25 g e pesquisa de outras espécies de *Listeria* e foram realizadas zaragatoas às superfícies e equipamentos devido ao processo de investigação decorrente. A nível do estabelecimento industrial, nos alimentos em que é possível ocorrer o crescimento da bactéria, a bactéria deve estar ausente em 25 g no momento que o alimento deixa de estar sob o controlo do operador da empresa, a menos que o produtor possa demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil (Regulamento (CE) nº 2073/2005). Assim, no decorrer das acções de fiscalização aos estabelecimentos de produção (indústrias), cujos resultados na 1ª Operação foram não satisfatórios, foram colhidas amostras para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25 g, tal como prevêem os parâmetros legais. No âmbito da investigação do surto, as amostras foram igualmente analisadas para a contagem de *Listeria monocytogenes* e foram executadas zaragatoas aos equipamentos e superfícies, posteriormente analisadas no referido laboratório da ASAE. Foram considerados resultados não satisfatórios amostras com contagem de *Listeria monocytogenes* acima das 100 ufc/g, amostras com presença de *Listeria monocytogenes* (pesquisa) e amostras com presença de outras espécies de *Listeria*.

3.3. Recolha e análise dos dados

Os dados oriundos das listas de verificação utilizadas nas inspecções e das respostas dos laboratórios foram introduzidos numa folha de cálculo, organizados por amostra, data de colheita, local de colheita (estabelecimento), localidade, tipo de estabelecimento, produtor, nº de controlo veterinário (se aplicável), data limite de consumo, resultado laboratorial (detecção ou enumeração) e pulsótipo e posteriormente foram processados no Microsoft Office Excel®.

Foi utilizada estatística descritiva para organizar os dados através de gráficos (histogramas) e tabelas.

Os mapas foram produzidos e retirados da aplicação Google Earth e as localidades marcadas com as referências indicadas nesta.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. 1ª Operação

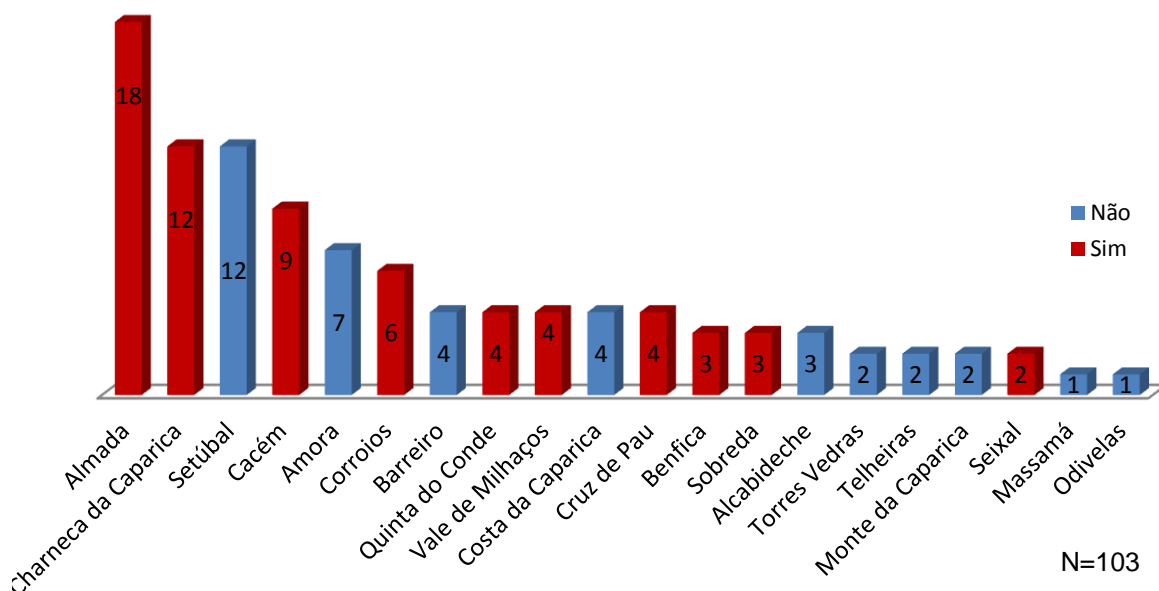
No decorrer da 1ª operação foram visitados 42 estabelecimentos em 20 localidades diferentes, dos quais 14 estavam incluídos nos 36 da listagem fornecida pela ARS (Administração Regional de saúde). Os restantes 28 estabelecimentos (não referidos pela ARS) foram inspeccionados na tentativa de abranger as áreas geográficas proximais às localidades referenciadas. Dos 36 estabelecimentos referidos, 22 não foram inspeccionados

por diversos motivos, nomeadamente informação insuficiente da localização dos estabelecimentos em causa.

3.4.1.1. Localidades abrangidas

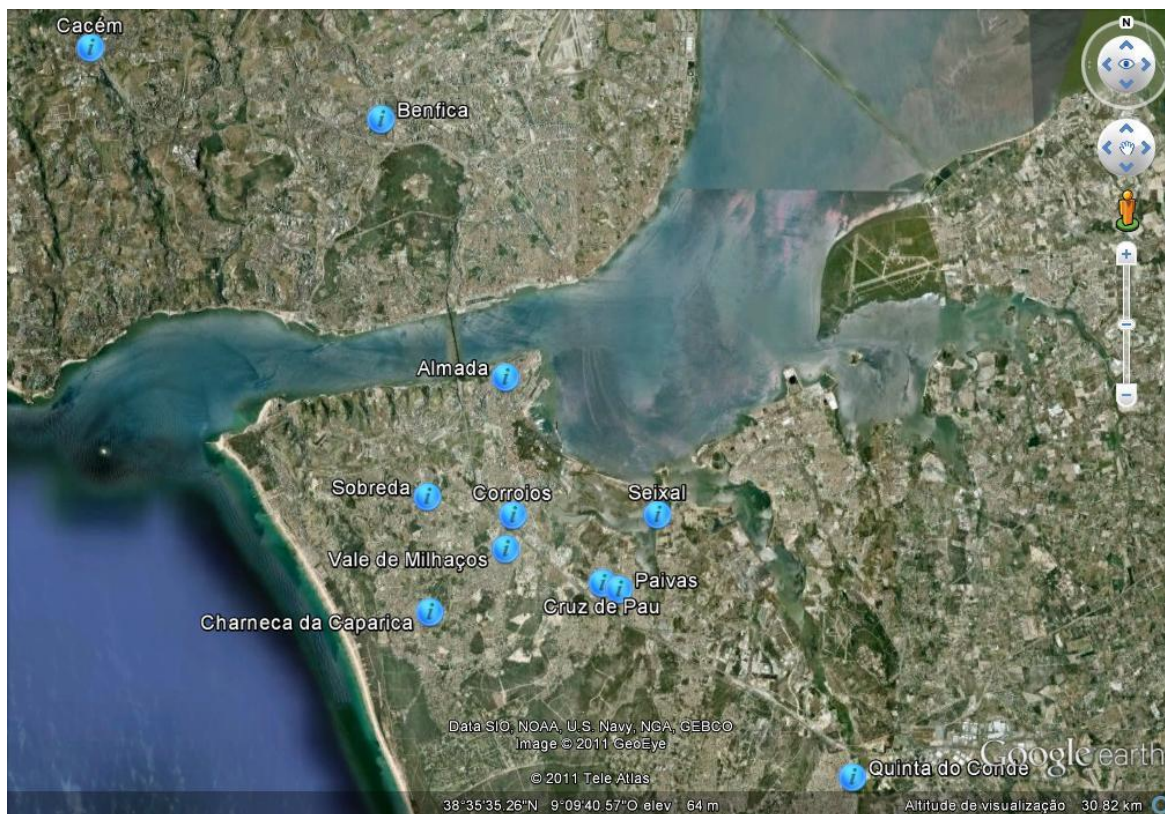
A operação cobriu 10 das 12 localidades referidas pela ARS, ficando por cobrir 2 localidades (Paivas e Alter do Chão). Abrangeu no entanto 10 outras localidades da região de Lisboa e Vale do Tejo (Gráfico 1). O número de estabelecimentos por localidade variou de um a sete. Indicado a vermelho encontram-se as localidades referenciadas nas informações disponibilizadas pela Administração Regional de Saúde e a azul estão as localidades que não foram referenciadas.


Gráfico 1 - Amostras colhidas no decorrer na 1ª Operação nas diferentes localidades e referência destas no inquérito epidemiológico



Geograficamente, as duas sub-regiões onde ocorreram os casos de listeriose humana foram a zona Sul do Tejo (Almada e Seixal) e a zona Norte do Tejo (Lisboa, Loures e Cacém). O Mapa (Figura 9) representa as localidades referenciadas pela ARS na Região de Lisboa e Vale do Tejo, excepto a localidade de Alter do Chão que se localiza na Região do Alentejo.

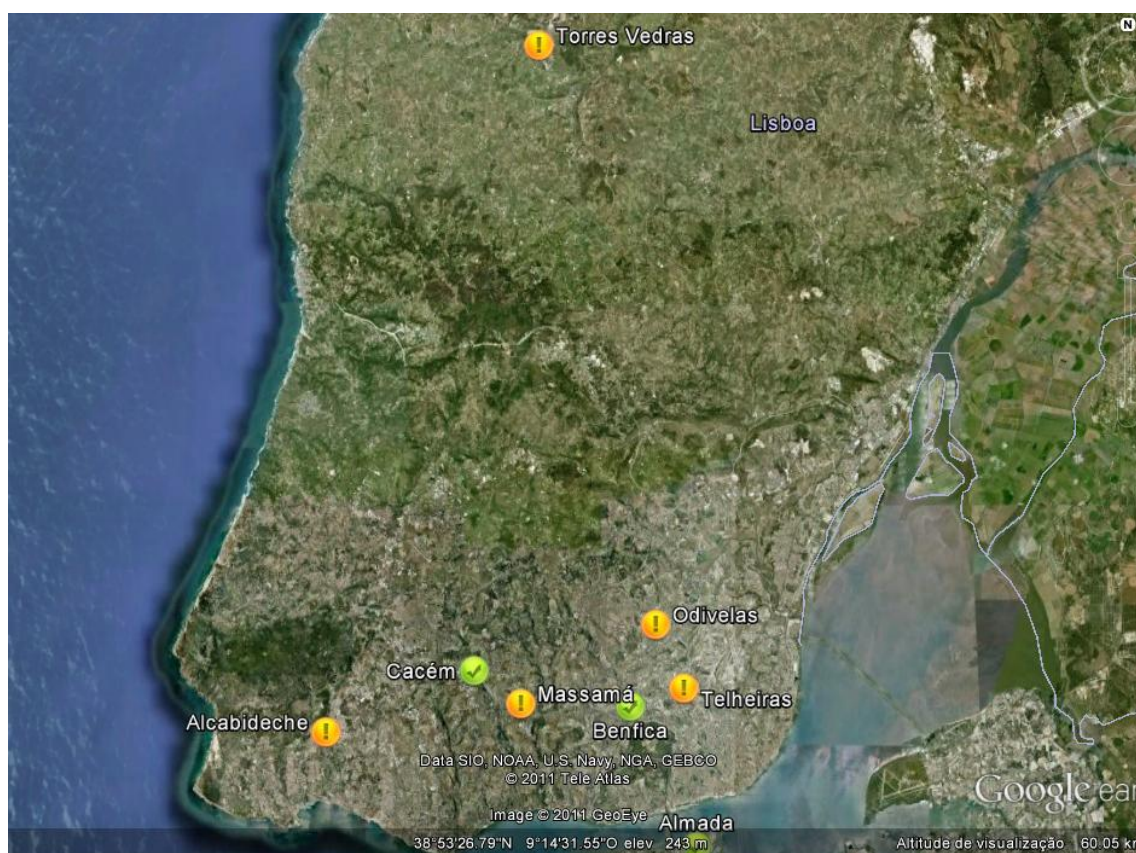
Figura 9 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico, realizado pela ARS.



 Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico, realizado pela ARS.

As 11 localidades referidas pela ARS (excepto Alter do Chão) localizam-se geograficamente próximas (uma distância máxima aproximadamente de 50 km entre elas). As localidades onde ocorreram colheitas de amostras, como referido, foram tanto as referenciadas como outras localidades, representadas geograficamente na Figura 10 e na Figura 11.

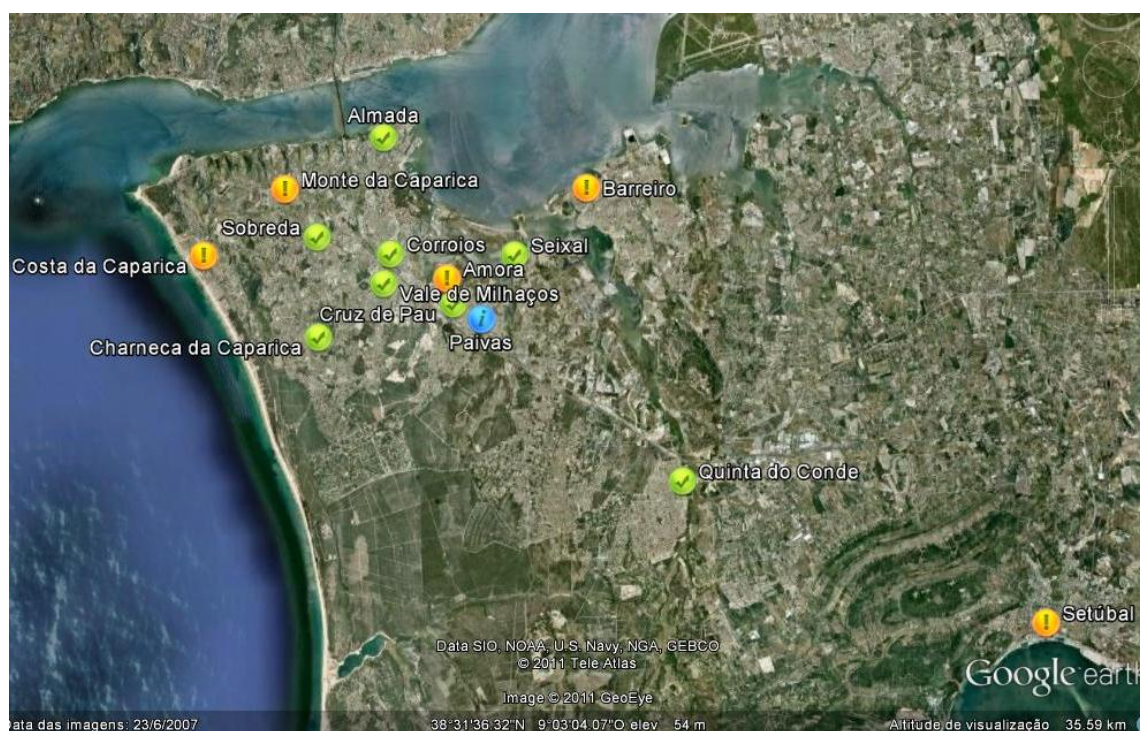
Figura 10 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico e das localidades onde ocorreram colheitas de amostras, realizadas pela ASAE, na região Norte, excepto Alter do Chão






- ✓ Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico onde ocorreram colheitas de amostras.
- ! Localidades não referenciadas no inquérito epidemiológico onde ocorreram colheitas de amostras.

No mapa referente às localidades do Norte (Figura 10), a localidade mais distante é Torres Vedras, com uma distância às localidades referidas pela ARS de Cacém e Benfica de aproximadamente 50 km. No Mapa referente às localidades do Sul (Figura 11) a localidade mais distante é de Setúbal, a cerca de 25 km de Quinta do Conde.

Figura 11 - Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico e das localidades onde ocorreram colheitas de amostras, realizadas pela ASAE, na região Sul.



-  Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico onde ocorreram colheitas de amostras.
-  Localidades referenciadas no inquérito epidemiológico onde não ocorreram colheitas de amostras.
-  Localidades não referenciadas no inquérito epidemiológico onde ocorreram colheitas de amostras.

3.4.1.2. Tipo de Estabelecimento inspeccionado

No inquérito epidemiológico foram indicados diferentes tipos de estabelecimentos de retalho como grandes superfícies, mini-mercados, mercados, talhos, estabelecimentos de restauração e também um lar de idosos e uma roulotte (outros). As acções de inspecção foram realizadas com base nas informações disponibilizadas pela ARS, estando os números representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Número e tipo de estabelecimentos inspeccionados no decorrer da 1ª Operação

Tipo de estabelecimento	Nº Estabelecimentos referidos pela ARS	%	Nº de estabelecimentos visitados	%	Nº estabelecimentos visitados e referidos pela ARS	%
Grande Superfície	9	25%	14	33%	4	28,6
Mini-mercado	9	25%	13	31%	1	7,1
Mercado	4	11,1%	5	12%	4	28,6
Talho	6	16,7%	5	12%	3	21,4
Restauração	6	16,7%	5	12%	2	14,3
Outros	2	5,5%	0	0%	0	0
Total	36	100%	42	100%	14	100

3.4.1.3. Amostras colhidas

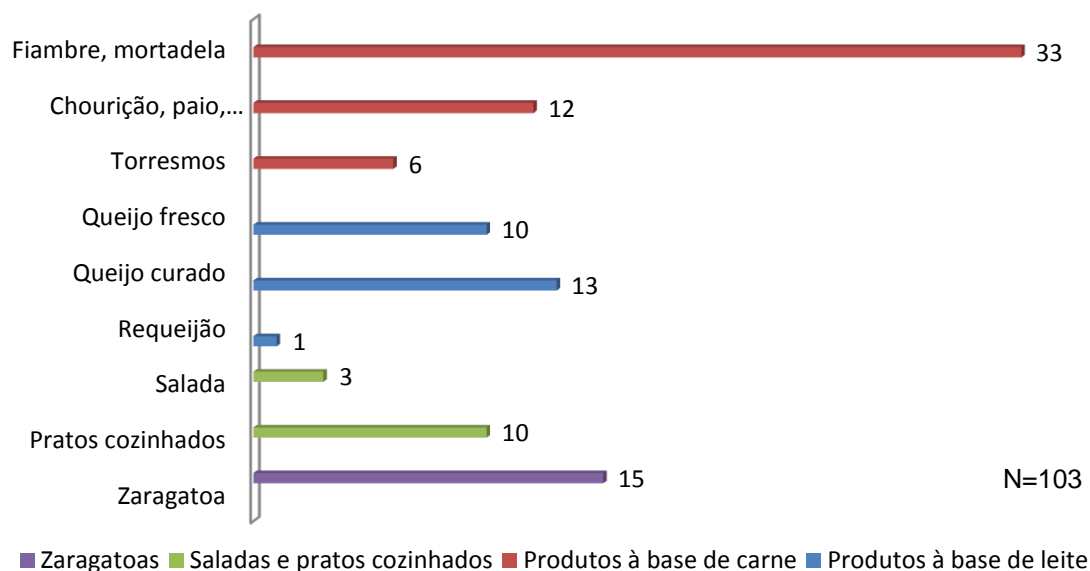
As colheitas de amostras foram efectuadas com base no tipo de produto (preferencialmente alimentos susceptíveis ao crescimento de *Listeria monocytogenes*) e com base nos produtos referenciados no inquérito epidemiológico (Tabela 6).

Tabela 6 - Estabelecimentos e produtos referidos no inquérito epidemiológico e produtos colhidos no decorrer da 1ª operação

Estabelecimentos referidos pela DGS e visitados	Produto referido no inquérito	Produto colhido
Estabelecimento A, Corroios	Fiambre e queijo fresco embalado	Prato cozinhado e salada
Estabelecimento B, Corroios	Sem referência	Prato cozinhado
Estabelecimento C, Cruz de Pau	Alheira	Chouriço e fiambre da perna
Estabelecimento D, Seixal	Sorvete	Prato cozinhado
Estabelecimento E, Almada	Queijo flamengo e hortofrutícolas	Fiambre e mortadela
Estabelecimento F, Cruz de Pau	Hortofrutícolas, queijo fresco não embalado	Torresmos e queijo curado
Estabelecimento G, Almada	Fiambre de hortofrutícolas e porco, queijo flamengo	Prato cozinhado
Estabelecimento H, Almada	Queijo fresco embalado	Fiambre e queijo curado
Estabelecimento I, Caparica	Sem referência	Queijo e fiambre
Estabelecimento J, Charneca da Caparica	Alheira	Fiambre e torresmos
Estabelecimento L, Benfica	Sem referência	Queijo fresco e torresmos
Estabelecimento M, Vale de Milhaços	Sem referência (Não consome queijo fresco não embalado)	Paio e mortadela
Estabelecimento N, Cacém	Queijo fresco embalado (ovelha)	Queijo fresco, flamengo e fiambre
Estabelecimento O, Cacém	Sem referência	Queijo e mortadela

As indicações fornecidas às brigadas sobre a colheita de amostras a realizar foram gerais, indicando o tipo de produtos a amostrar (queijo fresco, cortado no momento da venda, produtos de charcutaria fatiados no momento da venda, fiambre, chouriço, chourição, mortadela, presunto) e indicando os produtos referidos no inquérito epidemiológico, mas não estabelecendo relação entre estes e os estabelecimentos. Nos 42 estabelecimentos inspeccionados foram colhidas 88 amostras a produtos (fiambre, mortadela, chourição, paio, presunto, torresmos, pratos cozinhados, saladas, queijos curados, queijos frescos e requeijão) e efectuadas 15 zaragatoas a utensílios e equipamentos (fiambreiras, pinças, espátulas, facas), variando de uma a seis amostras por estabelecimento (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Número e tipo de amostras colhidas no decorrer da 1ª Operação



O maior número de amostras incidiu no fiambre e noutros produtos à base de carne (49 amostras), seguindo-se os queijos curados e frescos (23 amostras), como se observa no Gráfico 2.

3.4.1.4. Resultados da 1ª operação

O número de resultados não satisfatórios totaliza 8 amostras, significando uma percentagem global de 7,8% (EP=0,03%). Tal como referido, dentro dos resultados não satisfatórios estão incluídas amostras de géneros alimentícios e zaragatoas, estando estes apresentados na Tabela 7 e organizados por tipo.

Tabela 7 - Resultados não satisfatórios observados nos produtos ou equipamentos no decorrer da 1ª operação

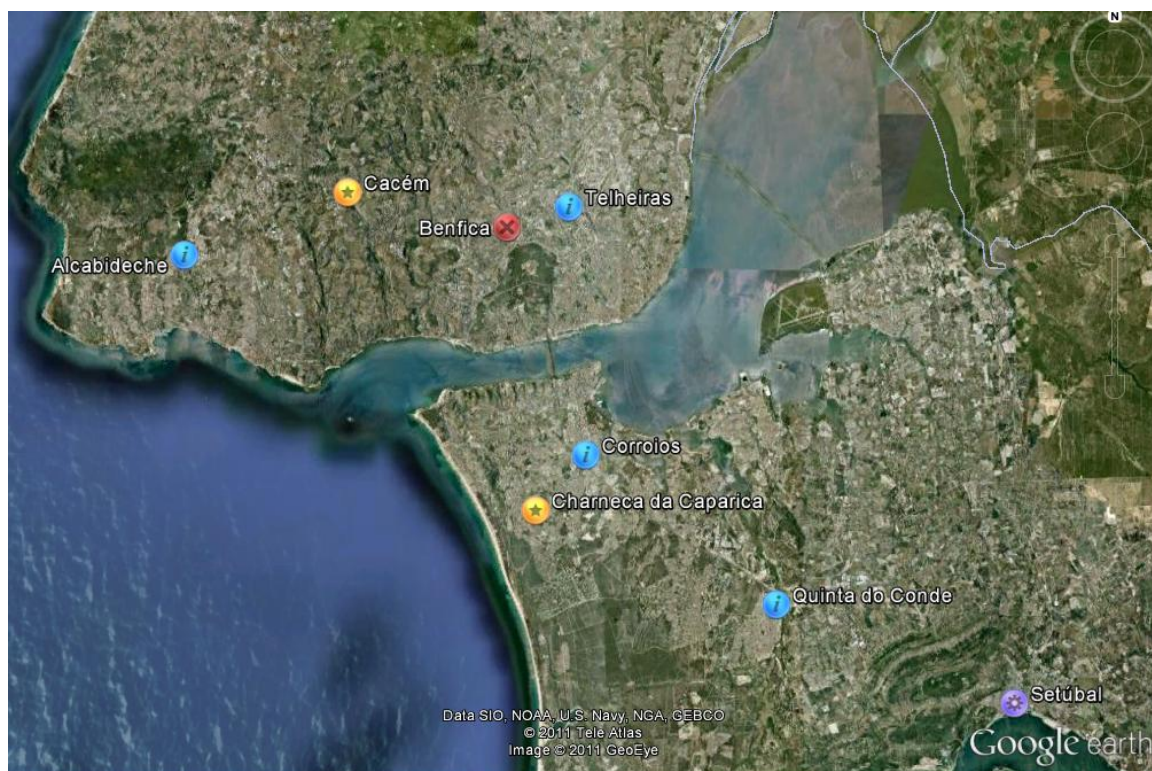
Resultados	Nº amostras positivas	Tipos de produtos ou Equipamento
Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	1	Queijo fresco
Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	2	Queijo fresco
Zaragatoa positiva a <i>L. monocytogenes</i>	1	Fiambreira
Outras espécies de <i>Listeria</i> ¹	4	Prato cozinhado, chourição e requeijão





Geograficamente, como se pode observar na Figura 12 a amostra com contagem de *Listeria monocytogenes* superior a 100 ufc/g em queijo fresco correspondeu à Frequesia de Benfica. As duas amostras positivas à pesquisa, igualmente em queijo fresco, provinham de unidades industriais diferentes e corresponderam às localidades de Charneca da Caparica e Cacém. A zaragatoa, com pesquisa positiva a *L. monocytogenes*, foi efectuada em Setúbal a uma fiambreira, no entanto a amostra de fiambre colhida e cortada na fiambreira apresentou resultado satisfatório.

Na pesquisa a outras espécies de *Listeria* encontraram-se duas amostras com resultados não satisfatórios de chourição, (colhidas na localidade de Quinta do Conde e Alcabideche), uma amostra de prato cozinhado (Corroios) e uma amostra de requeijão de ovelha (Telheiras).

¹ A presença de outras espécies de *Listeria* demonstra a possibilidade de crescimento de *L. monocytogenes* na medida em que há condições para o seu desenvolvimento

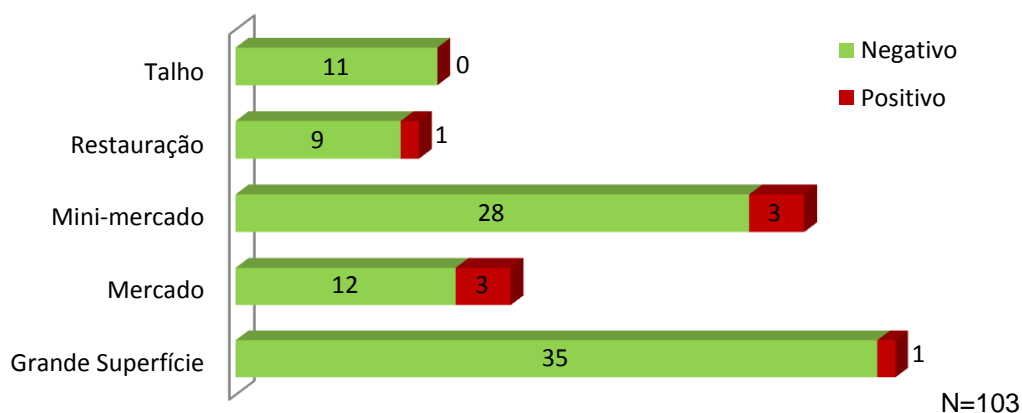
Figura 12 - Amostras positivas a *Listeria* no decorrer da 1ª Operação



-  Localidade com amostra positiva a contagem (acima de 100 ufc/g) de *L. monocytogenes*
-  Localidades com amostras positivas a pesquisa de *L. monocytogenes*
-  Localidades com amostras positivas a outros tipos de *Listeria*
-  Localidade com amostra positiva a *L. monocytogenes* de uma zaragatoa

De acordo com o tipo de estabelecimento inspeccionado, o Gráfico 3 resume os resultados obtidos na 1ª Operação.

Gráfico 3 - Resultados obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de estabelecimento onde foram colhidas amostras



Como referido, o maior número de amostras incidiram no fiambre e noutros produtos à base de carne mas das 33 amostras de fiambre e mortadela nenhum dos resultados foi positivo a *Listeria* (Gráfico 4).

Nas amostras efectuadas a chourição encontraram-se duas amostras positivas em 12 amostras testadas, na pesquisa de outras espécies de *Listeria* (16,67%, EP = 0,11%). A única amostra de requeijão foi igualmente positiva a outras espécies de *Listeria* e, dos 10 pratos cozinhados analisados, um foi positivo nesse mesmo parâmetro (10%, EP = 0,1%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Resultados obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de amostra

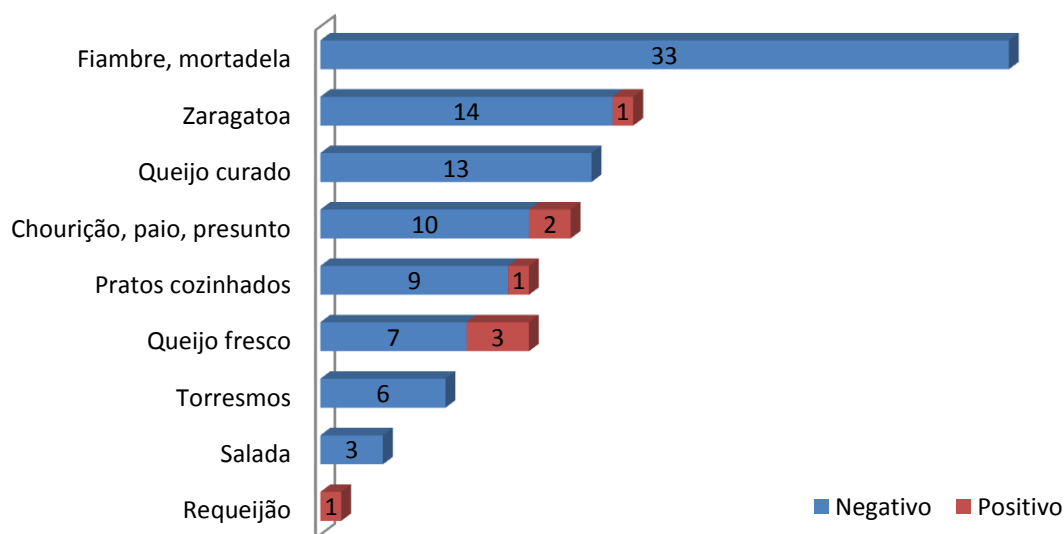
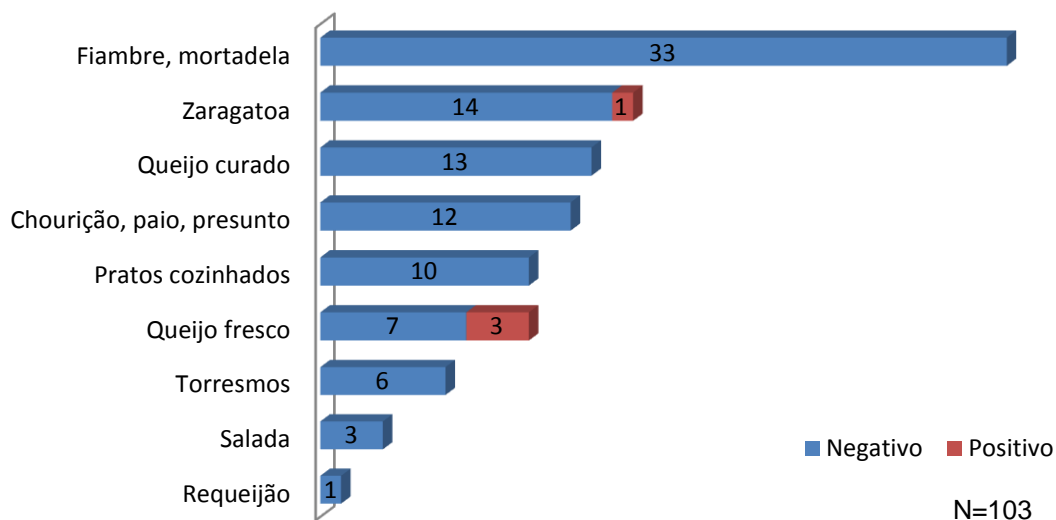


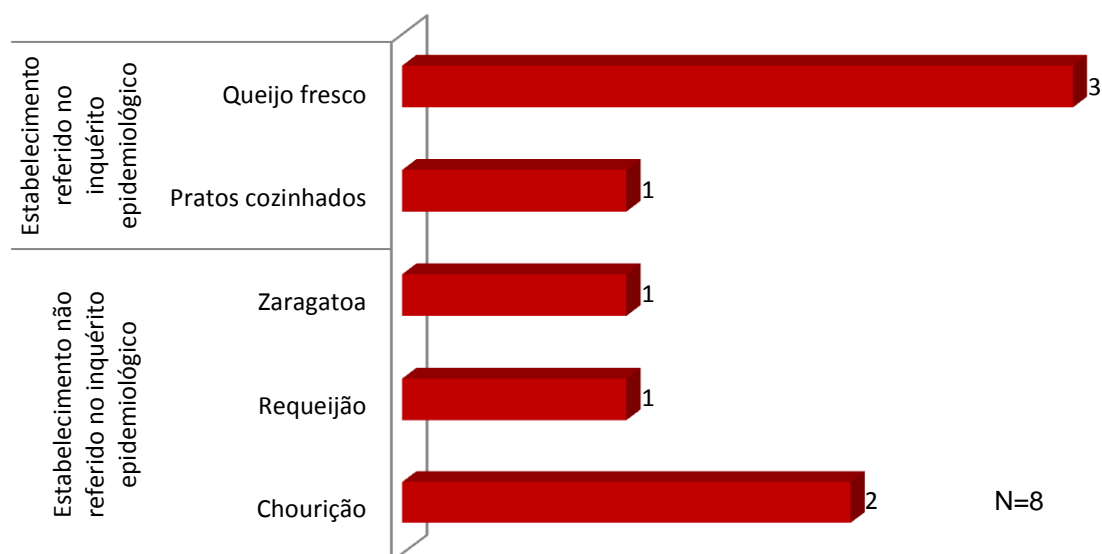
Gráfico 5 - Número de amostras positivas a *L. monocytogenes* no decorrer da 1ª Operação, consoante o tipo de amostra



Das 15 zaragatoas efectuadas a superfícies e equipamentos, uma foi positiva a *Listeria monocytogenes* (6,67%, EP=0,07%) e das 10 amostras efectuadas a queijo fresco 3 foram positivas a esse mesmo agente (Gráfico 5), o que demonstra uma positividade de 30% em queijo fresco (EP=0,15%).

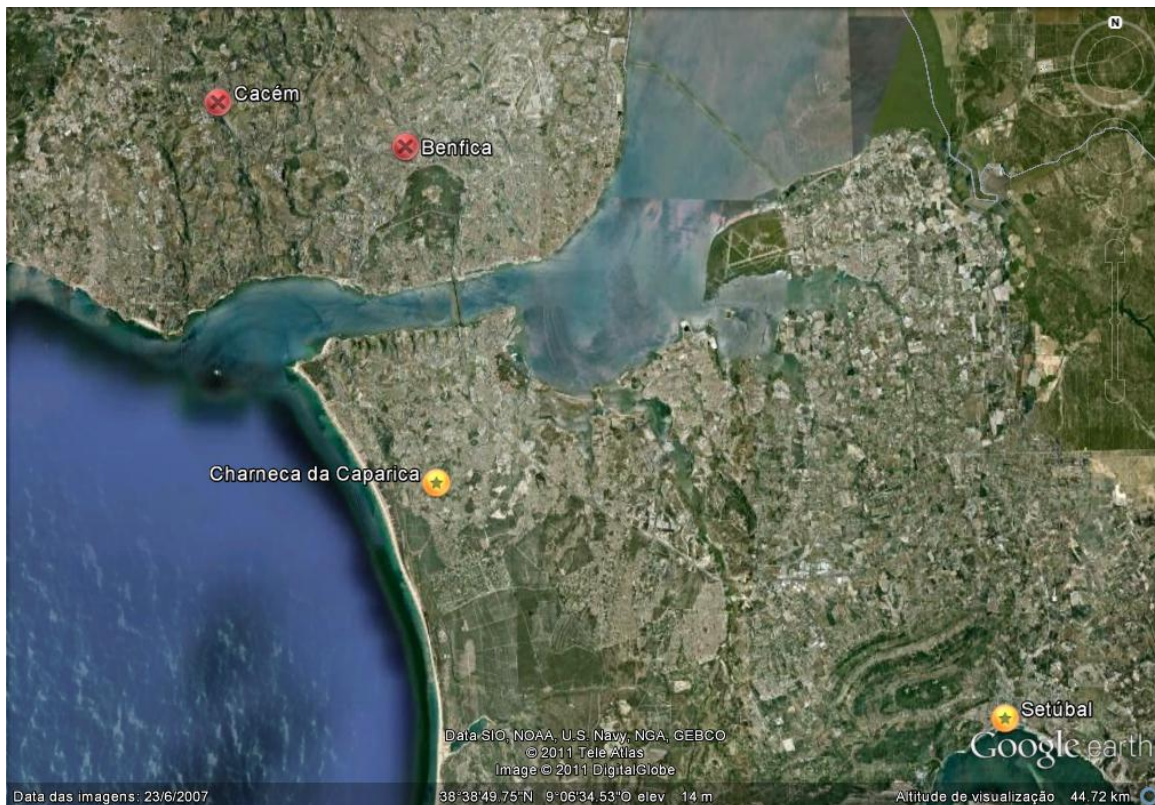
Metade das amostras com resultado não satisfatório foram colhidas em estabelecimentos referidos nas informações disponibilizadas pela ARS, como se pode verificar no Gráfico 6 (três amostras de queijo fresco e a de prato cozinhado), tendo sido as restantes colhidas em outros estabelecimentos na proximidade geográfica (zaragatoa, requeijão e as duas amostras de chourição).



Gráfico 6 - Resultados positivos obtidos na 1ª Operação, consoante o tipo de amostra e se o estabelecimento onde foi efectuada a colheita foi referido no inquérito epidemiológico



No decorrer da 1ª Operação, as quatro amostras positivas a *L. monocytogenes* foram enviadas para o laboratório de biotecnologia da Universidade Católica do Porto para serotipificação (três queijos frescos e uma zaragatoa) e duas amostras de queijo fresco apresentaram o mesmo pulsótipo dos isolados clínicos - isolados em Benfica e Cacém (Figura 13).

Figura 13 - Amostras positivas a *Listeria monocytogenes* no decorrer da 1ª Operação



-  Localidades com pulsótipo das amostras correspondente ao dos isolados clínicos
-  Localidades com pulsótipo não correspondente ao dos isolados clínicos

3.4.2. 2ª Operação

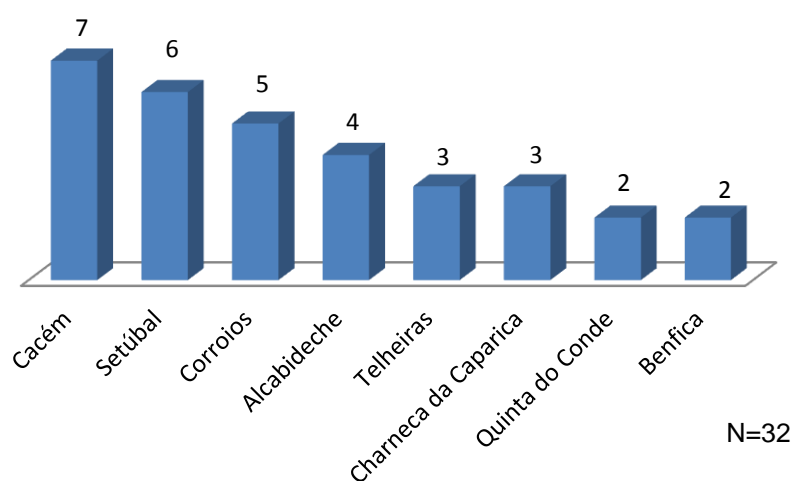
Foram inspeccionados os oito locais a nível do retalho, cujos resultados laboratoriais, quer aos géneros alimentícios, quer aos utensílios e equipamentos, apresentaram resultados não satisfatórios na 1ª operação. Foram ainda inspeccionados os estabelecimentos industriais onde foram produzidos 6 dos géneros alimentícios com resultados não satisfatórios. Quer a nível do retalho, quer a nível da Indústria foram efectuadas novas colheitas de amostras e efectuadas zaragoas aos utensílios e equipamentos.

3.4.2.1. Retalho

3.4.2.1.1. Localidades abrangidas

As amostras com resultados não satisfatórios no decorrer da 1ª operação foram colhidas em 8 estabelecimentos de retalho que se distribuem em 8 localidades diferentes (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Amostras colhidas no decorrer na 2ª Operação nas diferentes localidades



3.4.2.1.2. Tipo de Estabelecimento

Ocorreram 3 inspecções a estabelecimentos em mercados e foi efectuada, neste tipo de estabelecimento, um maior número de colheita de amostras (uma de queijo fresco e duas de queijo curado) e de execução de zaragatoas (9 zaragatoas), totalizando 12 amostras (Tabela 8).

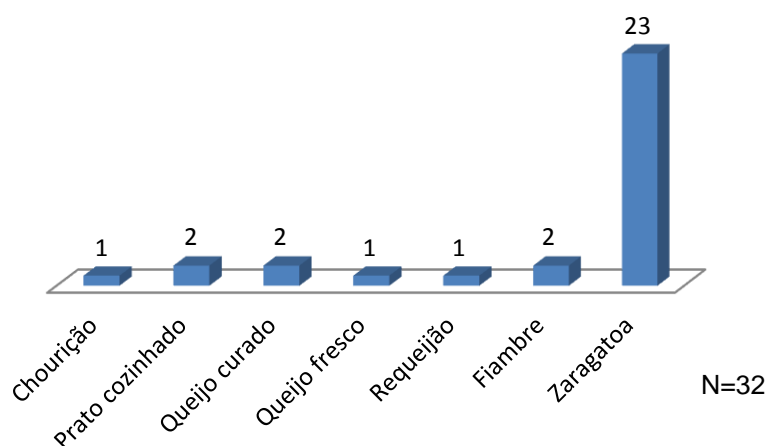
Tabela 8 - Tipo e número de estabelecimentos inspeccionados e o respectivo número de amostras colhidas no decorrer da 2ª operação a nível do retalho

Tipo de estabelecimento	Número de estabelecimentos inspeccionados	Nº amostras colhidas a género alimentício	Nº de zaragatoas efectuadas	Total
Mercado	3	3	9	12
Mini-mercado	3	2	7	9
Grande superfície	1	2	4	6
Restaurante	1	2	3	5
Total	8	9	23	32

3.4.2.1.3. Amostras colhidas

No decorrer das inspecções efectuadas no retalho foram colhidas 32 amostras, 9 das quais de géneros alimentícios (chourição, fiambre, prato cozinhado, queijo curado, queijo fresco e de requeijão), como demonstrado no Gráfico 8 e efectuadas 23 zaragatoas a utensílios e equipamentos (fiambreiras, espátulas, arcas frigoríficas, expositores, facas e colher).

Gráfico 8 - Tipo de amostras colhidas nos estabelecimentos no decorrer da 2ª operação



3.4.2.1.4. Resultados da 2ª operação - retalho

Os resultados obtidos na segunda colheita de amostras, no âmbito da operação *Listeria*, foram satisfatórios à contagem e detecção de *Listeria monocytogenes*. No entanto, em dois estabelecimentos os resultados foram não satisfatórios ao parâmetro “outras espécies de *Listeria*”: Um dos estabelecimentos, na localidade de Telheiras, tinha apresentado anteriormente não conformidade no mesmo parâmetro e o outro estabelecimento, localizado na Charneca da Caparica, tinha apresentado um resultado positivo à pesquisa, no decorrer da primeira operação.

Na Charneca da Caparica, a amostra colhida apresentou resultado não conforme no parâmetro a outras espécies de *Listeria*, demonstrando que se reúnem condições para o desenvolvimento microbiológico e reforçando a importância da inspecção a nível da produção.

3.4.2.1.5. Comparação entre a 1ª e 2ª Operação

Dos oito produtos positivos na 1ª operação, apenas 2 corresponderam ao mesmo produto/equipamento (queijo fresco de cabra na Charneca da Caparica, e zaragatoa em fiambreira em Setúbal) dos que foram analisados na 2ª operação.

Tabela 9 - Comparação entre as amostras colhidas na 1ª Operação e na 2ª Operação

Localidade	Amostra na 1ª operação	Amostra na 2ª operação
Charneca da Caparica	Queijo fresco de cabra	Queijo fresco de cabra
Setúbal	Zaragatoa a fiambreira	Zaragatoa a fiambreira
Benfica	Queijo fresco de cabra	Zaragatoas a equipamentos
Quinta do Conde	Chourição	Zaragatoas a equipamentos
Cacém	Queijo fresco	Queijo flamengo e mozzarella
Corroios	Prato cozinhado - canelones	Prato cozinhado - lasanha
Telheiras	Requeijão de ovelha	Requeijão de ovelha (outro produtor)
Alcabideche	Chourição	Fiambre

Dos restantes 6 que não foram analisados (queijo fresco de cabra em Benfica, chourição na Quinta do Conde, queijo fresco em Cacém, requeijão de ovelha em Telheiras, prato cozinhado - canelones em Corroios e chourição em Alcabideche), em 2 dos estabelecimentos correspondentes aos produtos foram efectuadas zaragatoas (Benfica e Quinta do Conde) e nos outros 4 os inspectores da ASAE optaram por colher amostras de outros produtos (queijo flamengo e *mozzarella* no Cacém, requeijão de ovelha de outro produtor em Telheiras, prato cozinhado - lasanha em Corroios e fiambre em Alcabideche), como apresentado na Tabela 9.

A não correspondência nos produtos amostrados na 1ª e 2ª operação deveu-se à inexistência dos mesmos para venda no decorrer da 2ª operação. Após a notificação dos retalhistas e dos produtores do produto, os produtores retiraram o produto do mercado ou os retalhistas não voltaram a comprar o mesmo, não estando disponível para amostragem sensivelmente um mês depois.

Da 1ª para a 2ª operação (a nível do retalho) houve um aumento de 15 zaragatoas efectuadas para 23, representando um aumento de 53%.

3.4.2.2. Indústria

No decorrer da 2ª operação foram programadas inspecções às indústrias correspondentes aos locais de produção dos géneros alimentícios com os resultados não satisfatórios na 1ª operação, excepto o estabelecimento de restauração por ser um estabelecimento de retalho e o estabelecimento com resultado positivo a zaragatoa efectuada ao equipamento. Sendo assim foram inspeccionadas seis unidades industriais. Apesar de, como referido anteriormente, o Regulamento (CE) nº 2073/2005 prever que a nível do estabelecimento de produção, nos alimentos susceptíveis ao crescimento de *L. monocytogenes*, não é permitido detectar a presença da bactéria em 25 g de alimento antes do produto deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que os produz, as análises realizadas nesta 2ª Operação - indústria - incluíram igualmente a contagem de *L. monocytogenes*, não devendo esta ser acima de 100 ufc/g de alimento.

3.4.2.2.1. Localização

As indústrias inspeccionadas localizam-se nas localidades de Santana de Portel, Pedrógão e Alandroal (Alentejo), duas indústrias localizam-se em Mafra e uma em Famalicão.

3.4.2.2.2. Tipo de Estabelecimento

As indústrias anteriormente referidas correspondem a quatro indústrias de lacticínios e a duas de produtos à base de carne.

3.4.2.2.3. Amostras colhidas

No decorrer desta 2ª operação a nível das indústrias foram colhidas 32 amostras em cinco estabelecimentos, entre as quais 13 amostras a géneros alimentícios e 19 zaragatoas a equipamentos e superfícies. O tipo e número de amostras por estabelecimento industrial encontram-se discriminados na Tabela 10.

Tabela 10 - Tipo e número de amostras colhidas e zaragatoas efectuadas nos estabelecimentos industriais inspeccionados

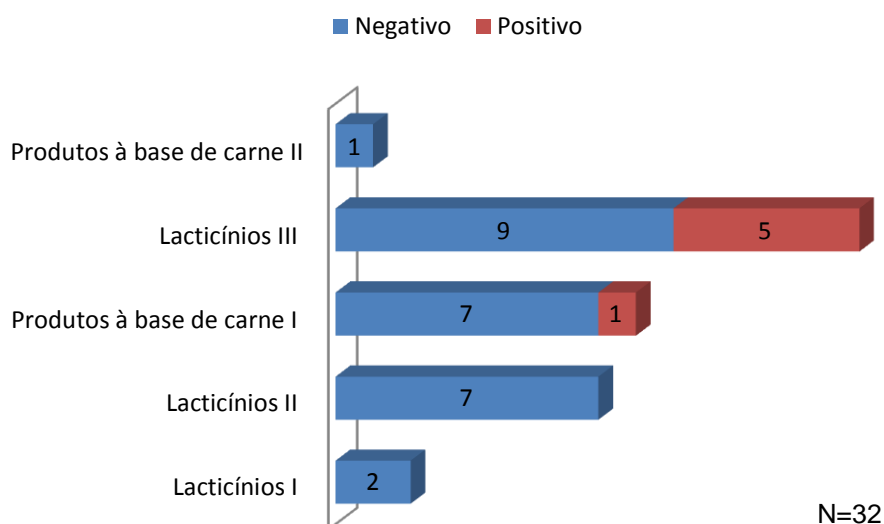
Tipo de indústria	Tipo de amostras	Nº de amostras efectuadas na 2ª Op.	Nº de zaragatoas efectuadas	Não conformidade da 1ª Operação	Pulsótipo igual ao dos isolados clínicos
Lacticínios I	Queijo fresco	2	Não foram efectuadas zaragatoas	Pesquisa positiva a <i>L. monocytogenes</i>	Sim
Lacticínios II	Queijo fresco	1	6	Pesquisa positiva a <i>L. monocytogenes</i>	Não
Produtos à base de carne I	Farinheira	1	5	Outras espécies de <i>Listeria</i>	Não
	Painho	1			Não
	Morcela	1			Não
Lacticínios III	Queijo de vaca e cabra fresco	6	8	Contagem positiva a <i>L. monocytogenes</i>	Sim
Produtos à base de carne II	Chourição	1	Não foram efectuadas zaragatoas	Outras espécies de <i>Listeria</i>	Não
Lacticínios IV	Queijo fresco	Não foram efectuadas amostras	Não foram efectuadas zaragatoas	Outras espécies de <i>Listeria</i>	Não
Total		13	19		

Nos estabelecimentos de lacticínios IV não foram colhidas amostras porque, tendo em conta que a não conformidade detectada nas operações foi a presença de outras espécies de *Listeria*, no decorrer da inspecção foram verificados os boletins de análises bacteriológicas das amostras de leite, assim como a respectiva periodicidade, não tendo sido detectados autos de infracção. Nos estabelecimentos de lacticínios I e IV e no estabelecimento de produtos à base de carne II não foram efectuadas zaragatoas pois as inspecções não foram acompanhadas por técnicos do GTP.

3.4.2.2.4. Resultados da 2ª operação – indústria

Na 2ª Operação foram inspeccionadas seis indústrias e em cinco foram colhidas amostras, sendo que em duas delas se encontraram resultados positivos. Foram efectuadas 32 colheitas resultando em 6 amostras positivas, apresentando uma taxa de positividade de 18,7% (EP=0,05%). As amostras colhidas a nível das unidades industriais estão representadas graficamente no Gráfico 9. As amostras positivas incluem uma amostra positiva à pesquisa de *Listeria monocytogenes* e cinco amostras positivas à contagem da mesma (acima das 100 ufc/g).

Gráfico 9 - Amostras colhidas e dos resultados obtidos nos estabelecimentos industriais no decorrer da 2ª Operação - indústria



No estabelecimento de lacticínios I foram colhidas duas amostras ao género alimentício produzido (queijo fresco) com resultados conformes e, no decorrer da inspecção à unidade industrial, não foi detectada qualquer irregularidade. No estabelecimento de lacticínios II foi colhida uma amostra de queijo fresco e efectuadas seis zaragatoas que apresentaram igualmente resultados conformes mas durante a inspecção desta unidade foram levantados três autos de infracção, sendo que um deles correspondeu à não existência de processos baseados nos princípios HACCP.

Na indústria de produtos à base de carne I, uma das três amostras efectuadas a géneros alimentícios embalados apresentou contagem de *Listeria monocytogenes* acima das 100 ufc/g em. As restantes cinco amostras correspondem a zaragatoas efectuadas a equipamentos. No decorrer desta inspecção foram levantados 3 autos de infracção em que uma delas consistiu no incumprimento dos requisitos gerais e específicos de higiene.

No estabelecimento de produtos à base de carne II foi colhida uma amostra com resultado satisfatório e foram registadas duas contra-ordenações, sendo uma delas referente ao incumprimento dos requisitos gerais e específicos de higiene (artigos 3.º e 4.º do Regulamento (CE) n.º 852/2004).

Na indústria de lacticínios III foram analisadas 14 amostras, entre as quais seis amostras de queijo de vaca e cabra fresco, em que cinco delas apresentaram resultados positivos à contagem de *Listeria monocytogenes* (83,3%, EP = de 0,17%). Duas das amostras de queijo fresco com resultados positivos apresentavam-se embaladas a vácuo. As restantes nove amostras consistiram em zaragatoas efectuadas a equipamentos e superfícies que apresentaram resultados negativos.

As análises decorrentes desta fase da Operação foram igualmente enviadas para caracterização genética por PFGE no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto e as amostras de queijo de vaca e cabra fresco colhidas na indústria de lacticínios III apresentaram o mesmo pulsótipo que os isolados clínicos, ou seja, do pulsótipo que causou o surto de listeriose em humanos em Lisboa e Vale do Tejo.

3.4.3. Indústria de lacticínios com pulsótipo dos isolados clínicos

Na sequência das amostras positivas de queijo de vaca e cabra fresco produzidas pela indústria de lacticínios III e colhidas nas duas Operações, inicialmente a estabelecimentos de retalho e posteriormente a unidades industriais, todas as amostras positivas foram processadas pela técnica de PFGE e apresentaram o mesmo pulsótipo detectado a nível hospitalar nos seres humanos infectados. Tais resultados indicam que provavelmente os doentes desenvolveram a doença após o consumo deste alimento contaminado.

Após o conhecimento deste resultado foi dada notícia da mesma ao Ministério Público e registado o processo-crime com base no artigo nº 282 do Código Penal. Este documento refere nas alíneas a e b do ponto 1 “Quem no aproveitamento, produção, confecção, fabrico, embalagem, transporte, tratamento, ou outra actividade que sobre elas incida, de substâncias destinadas a consumo alheio, para serem comidas, mastigadas, bebidas (...) ou, por qualquer forma, entregar ao consumo alheio substâncias que forem objecto de actividades referidas (...) ou forem utilizadas depois do prazo da sua validade ou estiverem avariadas, corruptas ou alteradas por acção do tempo ou dos agentes a cuja acção estão expostas e criar deste modo perigo para a vida ou para a integridade física de outrem é punido com pena de prisão de um a oito anos”.

Assim, e no sentido de permitir investigar se a origem da *Listeria monocytogenes* nos queijos vendidos no mercado de Benfica estaria ao nível da unidade de produção ou, pelo contrário, estaria a jusante desta (transporte ou retalho), no dia 9 de Março de 2011 foi

realizada nova inspecção à indústria de lacticínios. Não tendo o Ministério Público determinado a realização de colheita de amostras, entendeu a brigada de Inspeção responsável pela fiscalização que não o poderia fazer no âmbito do processo-crime mas, devido apoio técnico especializado que GTP prestou nesta acção de fiscalização, foram colhidas amostras, no âmbito do Controlo Oficial de Géneros alimentícios (PNCA).

A unidade industrial, como referido anteriormente, localiza-se no Alandroal, Alentejo.

O processo de fabrico dos queijos produzidos por esta indústria consistia na recepção na matéria-prima (leites de vaca e cabra em separado) para tanques. Estes eram conduzidos para uma misturadora e pasteurizados. A mistura de leites era depois transferida para várias cubas onde se adicionava coalho, cálcio e sal e onde sofriam o processo de coagulação. A mistura era colocada numa bancada, prensada em cinchos pelos trabalhadores e colocada em câmaras frigoríficas com o rótulo adjacente.

3.4.3.1. Amostragem colhidas

Na acção de fiscalização foram colhidas amostras a vários níveis do circuito de produção: duas amostras de matéria-prima, leite de vaca e cabra colhido após a pasteurização e leite de vaca e cabra coalhado colhido da cuba de mistura também após pasteurização; cinco amostras de queijo (três delas embaladas a vácuo e as outras duas encontravam-se a granel) e foram realizadas zaragatoas a superfícies e equipamentos, de modo a ser possível avaliar a que nível do estabelecimento poderia ocorrer a contaminação do produto.

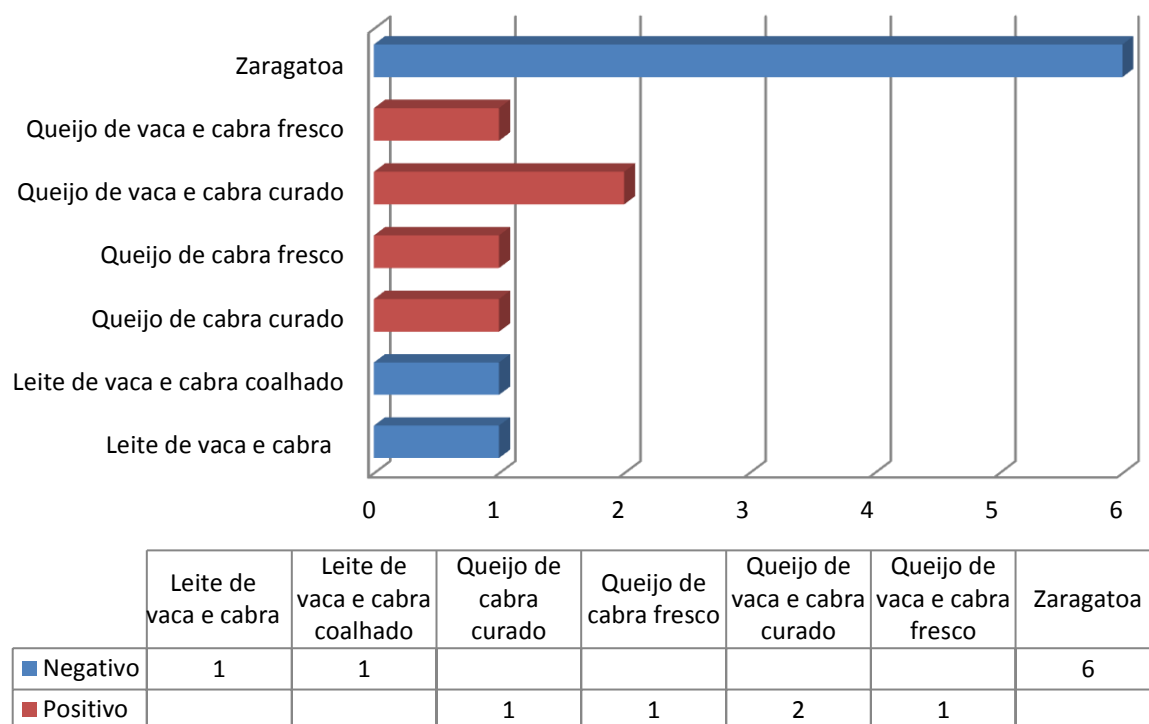
Ao contrário da inspecção anteriormente realizada, as amostras não incidiram apenas no tipo de queijo no qual foi inicialmente detectada a não conformidade (queijo de vaca e cabra fresco) mas igualmente em queijo de vaca e cabra curado (duas amostras), queijo de cabra curado (uma amostra) e queijo de cabra fresco (uma amostra). Os queijos curados, tal como os queijos frescos, eram produzidos com leite pasteurizado.

3.4.3.2. Resultados

Os resultados das amostras positivas (pesquisa e contagem) estão representados graficamente no Gráfico 10.

A matéria-prima apresentou resultados negativos, não foi detectada *Listeria monocytogenes* em 25 ml de leite de vaca e cabra mas todos os cinco queijos testados apresentaram-se contaminados por *L. monocytogenes*, em que três apresentaram contagem acima de 100 ufc/g (dois queijos de vaca e cabra curados e queijo de cabra curado). No entanto, nenhuma das zaragatoas apresentou resultados positivos à detecção da bactéria.

Gráfico 10 - Representação gráfica dos resultados das amostras colhidas na indústria de lacticínios



Tal como procedido anteriormente, as análises com resultados não conformes foram analisados pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto e os resultados foram concordantes com anteriormente confirmando-se que a *L. monocytogenes* detectada na Unidade corresponde aos mesmos pulsótipos (070/0101) de *Listeria* que originaram o surto de listeriose nos seres humanos. Tal indica que existe grande probabilidade de este ser o foco, ou pelo menos um dos focos, do surto de listeriose que causou numerosos óbitos nos seres humanos.

Após esta acção de fiscalização o operador do sector alimentar em questão suspendeu a actividade de modo a proceder a limpeza e desinfectação das instalações.

De realçar que foram detectadas várias infracções no decorrer da inspecção. Uma das infracções detinha-se na ausência de água potável nas instalações de produção. A água utilizada nas instalações provinha de um furo privado em que não eram realizados controlos microbiológicos à água. Não cumpria assim o disposto no artigo nº 3 do capítulo II do Regulamento (CE) nº 852/2004 que refere que “Todos os lavatórios ou outros equipamentos do mesmo tipo destinados à lavagem de alimentos devem dispor de um abastecimento adequado de água potável quente e/ou fria”, assim como refere na alínea a) do artigo 1º do capítulo VII do mesmo Regulamento, relativo ao abastecimento de água, “Deve ser providenciado um abastecimento adequado de água potável, a qual deve ser utilizada

sempre que necessário para garantir a não contaminação dos géneros alimentícios”. Após a cessação da actividade o operador do sector alimentar alterou o abastecimento de água passando esta a ser fornecida através da rede pública. Outra das infracções detinha-se na ausência de processos baseados nos princípios HACCP e, segundo o artigo nº 5 do capítulo II do Regulamento (CE) nº 852/2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios “Os operadores das empresas do sector alimentar criam, aplicam e mantêm um processo ou processos permanentes baseados nos princípios HACCP.”

Após a inspecção que deu origem ao encerramento da indústria foi emitida uma ordem no sentido de serem retirados todos os queijos provenientes da indústria em questão e comunicada às brigadas de inspectores da ASAE a nível nacional

Em Agosto de 2011 foram realizadas novas amostras de modo a avaliar a eficácia da limpeza e desinfecção e das alterações efectuadas na unidade de produção. Foram colhidas quatro amostras de queijo (três amostras de queijo de vaca e cabra fresco e uma amostra de queijo de vaca e cabra curado) e os resultados apresentaram-se negativos à pesquisa em 25 g e à contagem de *Listeria monocytogenes*.

No caso da indústria de lacticínios em questão não eram aplicados correctamente processos baseados nos princípios HACCP, reforçando, tal como Motarjemi & Käferstein (1999) referiram, que este sistema, quando aplicado correctamente apresenta um potencial para prevenir surtos visto que existem poucos registos de surtos de doenças transmitidas por alimentos com proveniência em indústrias onde é aplicado correctamente um sistema HACCP.

Duas marcas de queijos apresentaram resultados positivos a *L. monocytogenes* e corresponderam ao mesmo pulsótipo dos isolados clínicos, um queijo fresco em Benfica (contagem) e um queijo fresco no Cacém (pesquisa). Confirmou-se que a contaminação dos queijos colhidos em Benfica provinha da indústria (Lacticínios III) que os produziu pois os produtos colhidos a esse nível apresentaram resultados positivo e apresentaram o mesmo pulsótipo. Mas, ao nível da indústria de lacticínios (Lacticínios I) que produziu os queijos com resultado positivo a pesquisa a *L. monocytogenes* na localidade de Cacém, foram colhidas duas amostras de queijo fresco e estas apresentaram resultado negativo. Tendo em conta que a nível do estabelecimento de retalho se confirmou que os dois produtos (queijo fresco) estiveram expostos ao mesmo tempo e no mesmo espaço físico, que o estabelecimento de retalho do Cacém adquiriu queijo fresco que era proveniente do mesmo lote com resultado positivo à contagem de *L. monocytogenes* em Benfica e que ambos se encontravam não embalados, há uma forte indicação de ter ocorrido contaminação cruzada.

3.4.4. Plano Nacional de Colheita de Amostras

3.4.4.1. PNCA entre a 1ª e a 2ª Operação

No âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras, que decorre continuamente e em simultâneo com a Operação *Listeria*, foram colhidas amostras, entre a 1ª e a 2ª operação, em sete dos oito estabelecimentos referidos na 1ª Operação (excepto no Cacém). Foi colhido um total de oito amostras a géneros alimentícios e duas apresentaram resultados positivos (uma a contagem e outra a detecção em 25 g).

A amostra com contagem acima das 100 ufc/g foi colhida na localidade de Benfica e consistiu na mesma marca de queijo de vaca e cabra fresco (ou seja, proveniente do estabelecimento industrial identificado anteriormente como a indústria de lacticínios III) e com o mesmo pulsótipo dos isolados clínicos. A amostra positiva à pesquisa em 25 g, colhida na Charneca da Caparica, foi igualmente de queijo fresco mas o pulsótipo não correspondeu ao dos isolados clínicos.

3.4.4.2. PNCA após Operação *Listeria*

Igualmente no âmbito deste plano foram, posteriormente à 2ª Operação, colhidas amostras em localidades e estabelecimentos que estavam referidos pela DGS mas que não tinham sido realizadas durante a 1ª Operação.

Dos 22 estabelecimentos referidos que não foram inspeccionados no âmbito da Operação *Listeria*, oito foram inspeccionados posteriormente (Fevereiro de 2011) tendo sido detectada uma amostra positiva a *Listeria monocytogenes*. Os estabelecimentos inspeccionados localizam-se nas localidades de Corroios, Cruz de Pau (2), Quinta do Conde, Almada, Sobreda, Paivas e Alter do Chão, sendo estas duas últimas as localidades que não foram cobertas no decorrer das Operações *Listeria*. Durante estas inspecções, em seis dos oito estabelecimentos, as brigadas colheram as amostras de produtos que tinham sido referidas como as recomendadas, com base nas informações da DGS. No estabelecimento em Sobreda foram colhidos produtos à base de carne enquanto as indicações consistiam em lacticínios e no estabelecimento de Alter do Chão não havia qualquer referência de género alimentício. No total foram colhidas 23 amostras.

A amostra positiva a *L. monocytogenes* foi colhida num estabelecimento na localidade de Almada (a 1 de Fevereiro de 2011) e correspondeu ao produto “queijo de vaca e cabra fresco” da indústria de lacticínios III (anteriormente referenciada com amostras positivas na localidade de Benfica e com pulsótipo igual ao dos isolados clínicos).

Como referido inicialmente, dos 36 estabelecimentos referidos pela ARS, 22 não tinham sido inspeccionados por diversos motivos, nomeadamente informação insuficiente quanto à localização dos estabelecimentos em causa. Posteriormente, e com a “intervenção” do PNCA na investigação, foram inspeccionados mais oito estabelecimentos aumentando para 22 estabelecimentos inspeccionados (dos 36 referidos pela DGS), ficando a restar 14 estabelecimentos. Do número total de estabelecimentos visitados (42), 14 eram referidos pela ARS mas os restantes 28 localizam-se em outras áreas geográficas como Setúbal, Amora, Barreiro, Costa da Caparica, Alcabideche, Torres Vedras, Telheiras, Monte da Caparica, Massamá e Odivelas. As brigadas inspectivas da ASAE incidiram não apenas nas localidades referidas mas em mais 10 localidades. O PNCA, no âmbito da investigação do surto, teve assim uma importância relevante permitindo colmatar desvios ocorridos no decorrer das Operações Listeria, alargar a colheita de amostras a mais duas localidades (Paivas e Quinta de Conde) onde não tinham sido colhidas amostras anteriormente e conduziu à colheita de mais 23 amostras em estabelecimentos referidos no inquérito epidemiológico. Dessas 23 amostras uma apresentou resultado positivo à contagem e apresentava o mesmo pulsótipo que os isolados clínicos, verificando-se assim que as inspecções, mesmo depois do final da Operação Listeria, foram relevantes e permitiram detectar amostras positivas que estavam a ser comercializadas e consumidas, na zona de Almada. Foi possível verificar que a ausência das informações completas fornecidas às brigadas levou a uma percentagem superior de insucesso nas amostras requisitadas colhidas (1ª operação) em comparação com as amostras colhidas aquando do fornecimento das informações totais aos inspectores (PNCA).

Além do referido relativamente ao PNCA e, como citado anteriormente, não tendo o Ministério Público determinado a realização de colheita de amostras na indústria de lacticínios contaminada com *L. monocytogenes* e com pulsótipo 070/101, foi possível, no âmbito PNCA que os técnicos do GTP as realizassem.

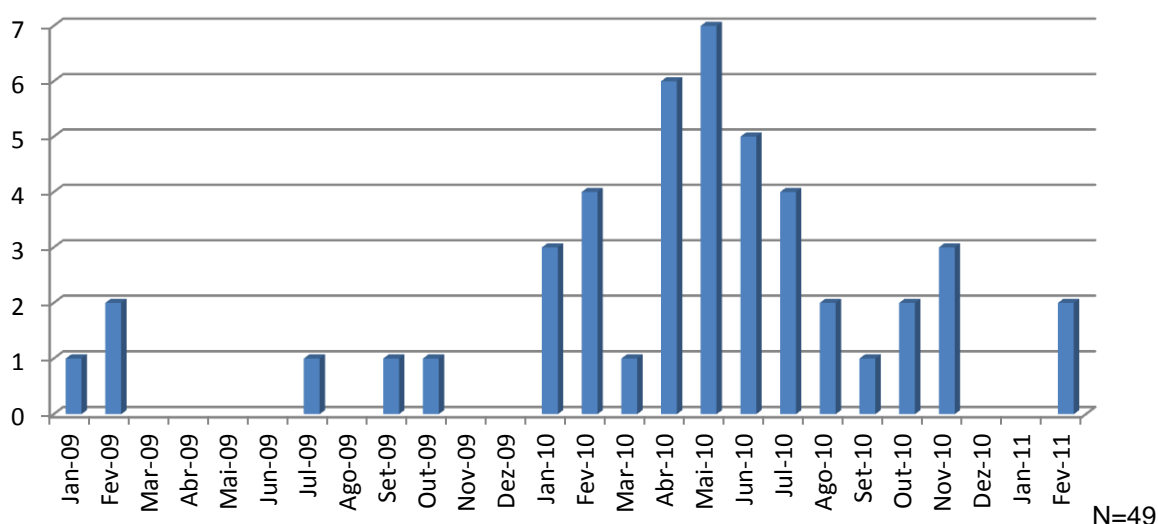
3.4.5. Casos clínicos

De Janeiro de 2009 até Fevereiro de 2011 alguns dos hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo notificaram 46 casos de infecção por *Listeria monocytogenes*. Amostras de produto biológico (sangue, placenta ou LCR) foram analisadas no laboratório da ESB- UCP para serotipificação e determinação do pulsótipo através de PFGE. Dos 46 casos, 26 foram causados pelo mesmo pulsótipo de *Listeria monocytogenes* (serótipo 4b, pulsótipo 70/101) e os restantes 20 não foi possível identificar o pulsótipo por diversas razões, a maioria delas de ordem laboratorial (“isolado” não guardado ou sem requisitos de rastreabilidade, entre outros). Apesar de não se poder identificar o pulsótipo estes casos não puderam ser excluídos do surto por terem ocorrido no espaço geográfico onde este foi identificado

(Lisboa e Vale do Tejo) e no mesmo espaço temporal.² O Gráfico 11 representa os casos clínicos de listeriose identificados entre Janeiro de 2009 e Fevereiro de 2011.

Como referido anteriormente, no estudo de Magalhães et al. (2008), os isolados do estudo provenientes de Lisboa pertenciam aos pulsótipos 0016 e 0104 e os isolados de casos de Almada pertenciam aos pulsótipos 0008, 0083, 0100, 0101, 0104 e 0111. O pulsótipo 0101 foi isolado (três vezes) em Portugal em casos esporádicos mas nunca tinha sido antes isolado a partir de géneros alimentícios (Almeida et al., comunicação pessoal, 2011).

Gráfico 11 - Representação gráfica dos casos clínicos registados entre Janeiro de 2009 e Fevereiro de 2011



A maioria dos doentes eram residentes nos concelhos de Almada, Barreiro, Corroios, Sesimbra, Seixal e Setúbal (26 casos). Os restantes casos de doença, cuja residência se situava fora daquela zona geográfica, tinham em comum a deslocação ou permanência na referida zona geográfica no período que antecedeu o diagnóstico laboratorial da infecção.

Dos 46 casos a maior parte eram do sexo masculino, 29 casos, dos quais 17 confirmados, 15 do sexo feminino (7 confirmados) e os restantes 2 casos estas informações não estavam disponíveis.

Aproximadamente metade dos casos ocorreu em pessoas maiores de 65 anos. Houve dois casos de transmissão vertical mãe-filho, num dos quais com um feto morto. Verificou-se ainda infecção num segundo recém-nascido mas sem sintomatologia/doença manifesta na mãe.

² De realçar que os dados apresentados foram fornecidos em Março de 2011 e dados mais recentes não foram disponibilizados..

A maioria dos doentes foram internados por quadros múltiplos de patologias crônicas com imunodepressão, quer por causas não infecciosas (diabetes, doença hepática crónica, insuficiência cardíaca descompensada, neoplasias, linfomas não Hodgkin, leucemias, síndromes mielodisplásicas, corticoterapias prolongadas por artrite reumatóide/ neurite, quimioterapia), quer por causas infecciosas (infecção por VIH, hepatites infecciosas, leishmaniose) ou mistas.

A taxa de fatalidade, nos 44 casos em que o estado vital do doente foi disponibilizado, foi de 43,5% (EP=0,07%).

4. Conclusões

A investigação do surto ocorrido em Lisboa e Vale do Tejo decorreu entre Outubro de 2010 e Março de 2011. No total foram analisadas 167 amostras, entre as quais 57 zaragatoas e 110 amostras a géneros alimentícios; 42 estabelecimentos de retalho foram inspeccionados, cobrindo 20 localidades, e seis indústrias foram fiscalizadas, encaminhando para uma aproximação ao foco (ou um dos focos) do surto ocorrido. Importante realçar que, perante a ausência de medidas específicas delineadas em Portugal (legislação específica para estas situações) para proceder na investigação de um surto, as medidas tomadas no decorrer foram baseadas na cooperação entre as várias entidades (ESB- UCP, ARS-DGS e ASAE). Estas permitiram a identificação do ou de um dos produtos responsáveis pelo desenvolvimento de listeriose em vários consumidores, demonstrando a importância da comunicação entre entidades, assim como a partilha de conhecimentos científicos. A análise dos dados epidemiológicos permitiu o encaminhamento da investigação e a colheita de dados realizada pela ASAE juntamente com a tipificação dos isolados clínicos contribuíram para a investigação deste surto.

A ASAE procedeu à investigação ambiental e alimentar do surto e, tendo em conta os objectivos deste passo específico de investigação, foi identificada uma origem que apresentava uma relação com os isolados clínicos mas, por não ter sido identificado o ponto de contaminação no estabelecimento que produziu os queijos, não foi possível definir o modo e a extensão da contaminação. Outro objectivo definido é a identificação e implementação de medidas correctivas e dentro destas destaca-se o encerramento da indústria, a retirada dos queijos contaminados do circuito comercial e alterações no processo de fabrico. Após o encerramento e a revisão do processo de fabrico (apesar de não ter sido identificado o ponto de contaminação), assim como a limpeza e desinfecção das instalações, a contaminação dos queijos no estabelecimento industrial cessou, como se verificou pelas quatro amostras efectuadas a queijo fresco e curado que apresentaram resultados negativos. Como referido no capítulo 2.5, as medidas de controlo devem ser aplicadas o mais rápido possível e devem ser executadas assim que há o conhecimento do foco de um surto. Neste surto em concreto as medidas correctivas foram tomadas 4 meses (de Novembro de 2010 a Março de 2011) após a suspeita de um queijo contaminado com *Listeria monocytogenes* (com uma contagem de bactérias superior a 100 ufc/g) e com pulsótipo igual ao dos isolados clínicos.

Portugal é o único, de 17 países da Europa que não têm activo, pelo menos, um sistema de vigilância e é dos únicos Estados Membros em que a listeriose não é de notificação obrigatória, o que dificulta a detecção precoce de surtos.

Seria assim interessante o desenvolvimento de um protocolo entre as várias entidades responsáveis para, em situações de futuros surtos de listeriose, serem activadas medidas protocoladas e padronizadas, inclusive formar equipas especializadas de modo a ser possível intervir com a maior brevidade possível. Os principais componentes de um protocolo desta natureza, contemplariam, a nível da investigação epidemiológica a realizar pela DGS, os detalhes dos dados a serem recolhidos junto de todos os doentes, o processamento cuidadoso dos mesmos e o formato e conteúdo dos dados a fornecer à ASAE para apoiar a investigação de campo necessária. A nível desta entidade o protocolo para a investigação ambiental e alimentar contemplaria os critérios de selecção de amostras a recolher nos locais identificados (amostras de alimentos identificados no inquérito epidemiológico e amostras de alimentos susceptíveis do crescimento de *Listeria*) e nas localidades referidas. No protocolo de investigação de surto deverão estar contempladas as medidas a tomar nos locais positivos a *Listeria monocytogenes*, como a realizar inspecções subsequentes mais detalhadas, tanto a nível do retalho como a nível da indústria. No decorrer das inspecções seria importante recorrer à realização de colheita de amostras ambientais e alimentares nas várias fases do processo de fabrico e na fase de armazenamento, assim como à análise das condições gerais de higiene, à revisão de registos de saúde, alimentação e higiene dos funcionários, à avaliação do abastecimento de água e à medição de parâmetros pertinentes (aW, pH e temperatura). A investigação laboratorial, a ser realizada em laboratórios de referência, incluiria o processamento das amostras, realizando detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e caracterização serológica e genética. Será de extrema importância a definição e desenvolvimento de um sistema informativo de suporte para assegurar a rapidez na comunicação entre as entidades que em conjunto contribuem para a investigação de surtos.

É a propor também que, sendo o PNCA um plano activo e que realiza colheitas de amostras a *L. monocytogenes* rotineiramente, que todas as amostras positivas sejam analisadas tanto serotipicamente como geneticamente, permitindo monitorizar os pulsótipos encontrados nos géneros alimentícios, aliando as funcionalidades da autoridade competente ASAE com o desenvolvimento científico.

É a propor igualmente a continuidade da investigação e uma avaliação detalhada na área geográfica da indústria de lacticínios identificada como o foco (ou um dos focos) do surto de listeriose (Alandroal - Alentejo) pois não foi identificada qual a fonte de contaminação dos géneros alimentícios. Podendo a causa estar inerente ao processo de fabrico (más praticas de higiene por parte dos trabalhadores, água), como pode estar ao nível da matéria-prima (apesar das amostras terem apresentado resultado negativo), visto que a pasteurização

pode ser correctamente realizada mas pode suceder uma contaminação posterior por matéria-prima contaminada.

Apesar do surto de listeriose em que incide este trabalho ser o primeiro reportado em Portugal e de haver poucos casos reportados, deve ser dada prioridade à investigação desta doença. A listeriose é uma doença que, do ponto de vista de saúde pública, tem uma taxa de fatalidade muito elevada, sendo uma das causas de morte mais importantes por toxinfecção alimentar em países industrializados (EFSA, 2011), principalmente em idosos e imunodeprimidos. Tendo em conta a evolução dos hábitos alimentares com a preferência de aquisição de alimentos processados prontos a consumir e conservados em refrigeração, o envelhecimento da população, juntamente com as melhorias dos cuidados de saúde em doenças prolongadas, o perigo associado à listeriose em Portugal assim como em outros países desenvolvidos, é crescente. Do ponto de vista económico, as perdas decorrentes de um surto ao nível dos produtores são elevadas devido à falta de confiança dos consumidores. Assim, devem ser adoptadas medidas preventivas por parte das indústrias e deve ser dado especial interesse à educação dos consumidores pertencentes a grupos de risco (grávidas, idosos e imunodeprimidos).

Bibliografia

- Allerberger, F. & Guggenbichler, J. P. (1989). Listeriosis in Austria--report of an outbreak in 1986. [abstract] [versão electrónica]. *Acta Microbiol Hung.*, 36(2-3), 149-152. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2631503>
- Allerberger, F. & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 16-23. Acedido em Outubro, 22, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x/full>
- Almeida, G. N., Gibbs, P. A., Hogg, T. A. & Teixeira, P. C. (2006). Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases*, 6, 153.
- Almeida, G. N., Magalhães, R. B., Barbosa, J. B., Hogg, T. A. & Teixeira, P. C. (2009). Listeriosis en Portugal: 2004-2007. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 5, 90-92.
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. (2000). An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1236-1241. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200004273421702#ref14=&t=articleTop>
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T. & Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 150-155.
- Awaishah, S.S. (2010). Incidence and Contamination Level of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Ready-to-Eat Meat Products in Jordan. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Food Protection*, 73, 535-540. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2010/00000073/00000003/art00018>
- Ballen, P. H., Loffredo, F. R., Painter, B. (1979). *Listeria* Endophthalmitis. [abstract] [versão electrónica]. *Arch Ophthalmol.*, 97(1), 101-102. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://archophth.ama-assn.org/cgi/content/abstract/97/1/101>
- Barbuddhe, S., Hain, T. & Chakraborty, T. (2008). Comparative Genomics and Evolution of Virulence. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.

- Bassan, R. (1975). Bacterial endocarditis produced by *Listeria monocytogenes*. Case presentation and review of literature. [abstract] [versão electrónica]. *Am J Clin Pathol*, 63(4), 522-527. Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/804251>
- Bell, C. & Kyriakides, A. (2003). *Listeria A practical approach to the organism and its control in foods*. Second Edition. New York: CRC Press.
- Bille, J., Blanc, D. S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H.H., Tritten, M.L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J.M., Malinverni, R. Genné, D., Erard, P.H. & Waespi, U. (2006). Outbreak of human listeriosis. *EuroSurveill*, 11, 91-93. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=633>
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jacquet, C., Piffaretti, J.C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 69-73. Acedido em Abril 18, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/content/42/1/69.full.pdf+html>
- Bourry, A., Poutrel, B. & Roucort, F. (1995) Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: Characteristics of natural and experimental infections. *Journal of Medicine Microbiology*, 43, 125-132. Acedido em Agosto, 15, 2011, disponível em <http://jmm.sgmjournals.org/content/43/2/125.full.pdf+html>
- Brosch, R., Chen, J. & Luchansky, J. B. (1994). Pulsed field fingerprinting of *Listeriae*: Identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2584, 1994. Acedido em Novembro, 2011, disponível em <http://aem.asm.org/content/60/7/2584.full.pdf+html>
- Büla, C. J., Bille, J. & Glauser, M. P. (1995). An epidemic of foodborne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. [abstract] [versão electrónica]. *Clinical Infectious Diseases*, 20, 66 –72. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/20/1/66.short>
- Bunning, V. K., Crawford, R. G., Tierney, J. T. & Peeler, J. T. (1992). Thermotolerance of heat-shocked *Listeria monocytogenes* in milk exposed to high-temperature, short-time pasteurization. [abstract] [versão electrónica]. *Appl Environ Microbiol.*, 58(6), 2096-2098. Acedido em Outubro, 24, 2011, disponível em <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/58/6/2096~>
- Busch, L. A. (1971). Human Listeriosis, United States, 1967-1969. *The Journal of Infectious Diseases*, 123(3), 328. Acedido em Setembro, 22, 2011, disponível em <http://www.jstor.org/pss/30108746>

- Carrique-Mas, J. J., Hökeberg, I., Andersson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-Tham, M.-L., Osterman, B., Leffler, M., Steen, M., Eriksson, E., Hedin, G. & Giesecke, J. (2003). Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis?. [abstract] [versão electrónica]. *Epidemiology and Infection*, 130, 79-86. Acedido em Outubro, 3, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=141893>
- Centers for Disease Control and Prevention (2005). *Steps of an Outbreak Investigation*. Acedido em Fevereiro, 22, 2012, disponível em <http://www.cdc.gov/excite/classroom/outbreak/steps.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention (2011). Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with the Consumption of Hog Head Cheese Louisiana, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60 (13), 401-405. Acedido em Outubro, 6, 2011, disponível em http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6013a2.htm?s_cid=mm6013a2_w
- Centers for Disease Control and Prevention (2011). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado*. Acedido em Janeiro, 7, 2012, disponível em <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>
- Cheng, Y., Siletzky, R. M. & Kathariou, S. (2008). Genomic Divisions/Lineages, Epidemic Clones, and Population Structure. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.
- Chirgwin, K., Gleich, S. (1989). *Listeria monocytogenes* Osteomyelitis. [abstract] [versão electrónica]. In *Arch Intern Med.*, 149(4), 931-932. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/abstract/149/4/931>
- Churchill, R. L. T., Lee, H. & Hall, C. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64, 141-170. Acedido em Julho, 31, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701205003192>
- Codex Alimentarius (1997). *Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Commission Joint FAO/WHO Food Standards Programme*. Acedido em Novembro, 9, 2011, disponível em <http://www.haccphelp.com/Documents/Codex.pdf>
- Collins, M. D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M. & Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on

reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 240-6. Acedido em Julho. 27, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/content/41/2/240.long>

Cone, L. A., Leung, M. M., Byrd, R. G., Annunziata, G. M., Lam, R. Y., Herman, B. K. (2003). Multiple cerebral abscesses because of *Listeria monocytogenes*: three case reports and a literature review of supratentorial listerial brain abscess(es) [abstract] [versão electrónica]. *Surgical Neurology*, 59 (4), 320-328 Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090301903000569>

Conlan, J. W. & North, R. J. (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. [abstract] [versão electrónica]. *Infect Immun.*, 60(12), 5164-5171. Acedido em Setembro, 14, 2011, disponível em <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/60/12/5164>

Cortesi, M. L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N. & Pepe, T. (1997). Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10°C. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 209–214. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160597000640>

Cossart, P., Pizarro-Cerdá, J. & Lecuit, M. (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends in Cell Biology*, 13 (1), 23-31. Acedido em Setembro, 18, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892402000065>

Cousens, L. P. & Wing, E. J. (2000). Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol. Rev.*, 174, 150–159.

Cummins, A.J., Fielding, A.K., & McLauchlin, J. (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS [abstract] [versão electrónica]. *J. Infect.*, 28, 89. Acedido em Agosto, 10, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445394943478>

Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E. & Griffin, P. M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine*, 336, 100-106. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199701093360204#t=articleTop>

Dauphin, G., Ragimbeau, C. & Malle, P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing

- plants. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 51. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500004426>
- Decreto-Lei nº 560/99 de 18 de Dezembro. *Diário da República nº 293 – Série I – A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Dee, R. R. & Lorber, B. (1986). Brain abscess due to *L. monocytogenes*: case report and literature review. [abstract] [versão electrónica]. *Rev. Infect. Dis.*, 8, 968-977. Acedido em Setembro, 18 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/8/6/968.short>
- Destro, M.T., Leitão, M.F. & Farber, J. (1996). Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 705.
- Doganay, M. (2003). Listeriosis : clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 173-175. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0928-8244\(02\)00467-4/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0928-8244(02)00467-4/pdf)
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* , 42, 3819-3822.
- Ericsson, H., Eklow, A., Danielsson-Tham, M. L., Loncarevic, S., Mentzing, L. O. Persson, I., Unnerstad, H. & Tham, W. (1997). An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2904-2907. Acedido em Outubro, 3, 2011, disponível em <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/35/11/2904>
- European Food Safety Authority (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA Journal* 2007, 130, 259-352. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/130r.pdf>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011. 9 (3), 136-158, 321.
- Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. [versão electrónica]. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 55(3), 476-511. Acedido em Agosto, 10, 2011, disponível em <http://mmlbr.asm.org/content/55/3/476.full.pdf+html>

- Fedio, W. M., Schoonderwoerd, M., Shute, R. H. & Jackson, H. (1990). A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *Canadian Veterinary Journal*, 31, 773. Acedido em Novembro, 4, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1480871/pdf/canvetj00084-0043.pdf>
- Feresut, S. B. & Jones, D. (1988). Taxonomic Studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and Atypical *Lactobacilli*. *Journal of General Microbiology*, 134, 1165-1183. Acedido em Abril, 28, 2011, disponível em <http://mic.sgmjournals.org/content/134/5/1165.full.pdf+html>
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Brian D. Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. & Reingold, A. L. (1985). Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *The New England Journal of Medicine*, 312, 404-407. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm198502143120704>
- Fretz, R., Pichler, J., Sagel, U., Much, P., Ruppitsch, W., Pietzka, A. T., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Appl, G., Werber, D., Stark, K., Prager, R., Flieger, A., Karpíšková, R., Pfaff, G. & Allerberger, F. (2010). Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro Surveillance*, 15 (16), 2-3. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N16/V15N16.pdf>
- Frye, D. M., Zweig, R., Sturgeon, J., Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L. & Mascola, L. (2002). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. In *Clinical Infectious Diseases*, 35, 943-949. Acedido em Outubro, 3, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/35/8/943>
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987). *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. [abstract] [versão electrónica]. *Infect Immun*. 55(11), 2822-2829. Acedido em Setembro, 18, 2011, disponível em <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/55/11/2822>
- Gallagher, P. G. & Watanakunakorn, C. (1988). *Listeria monocytogenes* Endocarditis: A Review of the Literature 1950-1986. [abstract] [versão electrónica]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 20(4), 359-368. Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00365548809032469>
- Garrido, M. M., Martínez-Yélamos, S., Murillo, O. & Viladrich, P. F. (2010). Absceso cerebral del adulto por *Listeria monocytogenes*: presentación de 6 casos y revisión de la literatura médica. [abstract] [versão electrónica]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28 (2), 87-94. Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3665098>

- Gaulin, C., Ramsay, D., Ringuette, L. & Ismaïl, J. (2003). First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Can. Commun. Dis. Rep.*, 29, 181-186. Acedido em Outubro, 6, 2011, disponível em <http://www.collectionscanada.gc.ca/webarchives/20071214151854/http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/dr2921ea.html>
- Gaya, P., Saralegui, C. & Medina, M. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Raw Caprine Milk. *Journal of Dairy Science*, 79, 1936-194. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030296765633>
- Gombas, D. E., Chen, Y., Clavero, R. S. & Scott V. N. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Food Protection*, 66, 559-569. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2003/00000066/00000004/art00004>
- Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N.L., Hunter, S.B., Holt, K.G., Ramsey, F., Head, M., Levine, P., Johnson, G., Schoonmaker-Bopp, D., Reddy, V., Kornstein, L., Gerwel, M., Nsubuga, J., Edwards, L., Stonecipher, S., Hurd, S., Austin, D., Jefferson, M.A., Young, S.D., Hise, K., Chernak, E.D., Sobel, J. and the Listeriosis Outbreak Working Group. (2006). Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 29-36. Acedido em Outubro, 6, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/42/1/29.full.pdf+html>
- Goulet, V. & Brohier, S. (1989). Listeriosis in France in 1986: survey of hospital laboratories. [abstract] [versão electrónica]. *Pathol. Biol.*, 37, 206-211. Acedido em Setembro, 28, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2498829>
- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E. & Valk, H. (2006). Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. *EuroSurveill.*, 11, 79. Acedido em Outubro, 2, 2011, disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=629>
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G. & Veit, P. (1998). Listeriosis Outbreak Associated with the Consumption of Rillettes in France in 1993. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Infectious Diseases*, 177 (1), 155-160. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://jid.oxfordjournals.org/content/177/1/155.short>
- Graves, L. M., Hunter, S. B., Ong, A. R., Schoonmaker-Bopp, D., Hise, K., Kornstein, L., DeWitt, W. E., Hayes, P. S., Dunne, E., Mead, P. & Swaminathan, B. (2005). Microbiological Aspects of the Investigation That Traced the 1998 Outbreak of

Listeriosis in the United States to Contaminated Hot Dogs and Establishment of Molecular Subtyping-Based Surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2350-2355. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/43/5/2350>

Graves, L. M. & Swaminathan. B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 55–62. Acedido em Outubro, 22, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500005018#foot1>

Graves, L. M., Swaminathan, B. & Hunter, S. B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press.

Guerra, M. M., Mclauchlin, J., Bernardo, F. A. (2001). *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 16, 423-429.

Guerrero, M. L. F., Rivas, P., Rábago, R., Núñez, A., Górgolas, M. & Martinell, J. (2004). Prosthetic valve endocarditis due to *Listeria monocytogenes*: Report of two cases and reviews. [abstract] [versão electrónica]. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(2), 97-102. Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971203000377>

Handrick, W., Schwede, I., Tomalik, T. & Berthold, F. (2008). Arthritis due to *Listeria monocytogenes*. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 67(1), 68-71. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://www.springerlink.com/content/4551701170h25763/>

Health Canada, (2009) *Lessons learned: public health agency of Canada's response to the 2008 listeriosis outbreak, 2009*. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em <http://www.phac-aspc.gc.ca/fs-sa/listeria/2008-lessons-lecons-eng.php>

Health Canada. (2010). *Policy on Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Food*. Acedido em Outubro, 6, 2011, disponível em http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/consultation/init/listeria/draft-ebauche-eng.pdf

Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. & Fraser, D. W. (1986). An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patient from eight Boston hospitals. [abstract] [versão electrónica]. *Arch. Intern. Med.* 146, 520–524. Acedido em Setembro, 13, 2011, disponível em <http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/abstract/146/3/520>

- Hof, H. (2004). An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(8), 1727-1735. Acedido em Setembro, 23 , 2011, disponível em <http://informahealthcare.com/doi/10.1517/14656566.5.8.1727>
- Janakiraman, V. (2008). Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Rev Obstet Gynecol*, 1(4), 179–185. Acedido em Setembro, 23 , 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621056/>
- Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchreiser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, A., Veit, P. & Rocourt, J. (1995). Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiology*, 61, 2242–2246. Acedido em Outubro, 4 , 2011, disponível em <http://aem.asm.org/cgi/reprint/61/6/2242>
- Jensen, K.A., Ethelberg, S., Smith, B., Nielsen, E. M., Larsson, J., Mølbak, K., Christensen, J. J. & Kemp, M. (2010). Substantial increase in Listeriosis in Denmark 2009 in Euro Surveill, 15 (12).
- Jensen, A., Frederiksen, W. & Gerner-Smidt, P. (1994). Risk Factors for Listeriosis in Denmark, 1989–1990. [abstract] [versão electrónica]. In *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26 (2), 171-178. Acedido em Outubro, 4 , 2011, disponível em <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00365549409011781>
- Junttila, J. R., S.I. Niemelä, S. I. & Hirn, J. (1989). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria* [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Applied Microbiology*, 65, 321–327. Acedido em Julho 19, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01898.x/abstract>
- Jørgensen, L. V. & Huss, H. H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 127-131. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160598000713#sec3.1>
- Khan, K. M., Pao, W., Kendler, J. (2001). Epidural Abscess and Vertebral Osteomyelitis caused by *Listeria monocytogenes*: Case Report and Literature Review. [abstract] [versão electrónica]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33(9), 714-716. Acedido em Setembro, 20 , 2011, disponível em <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00365540110027033>
- Kuhn, M., Scotti, M. & Vázquez-Boland, J. A (2008). Pathogenesis. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.

- Lachica, R. V. (1990). Simplified Henry technique for initial recognition of *Listeria* colonies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1164-1165. Acedido em Julho 19, 2011, disponível em <http://aem.asm.org/content/56/4/1164.full.pdf+html>
- Lado, B. H. & Yousef, A. E. (2007). Listeriosis in Humans. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press.
- Lei nº 59/2007 de 4 de Setembro relativa à vigésima terceira alteração do Código Penal, aprovado pelo Decreto-Lei nº 400/82, de 23 de Setembro. *Diário da República* nº 170. Lisboa
- Leite, P., Rodrigues, R., Ferreira M., Ribeiro, G., Jacquet, C., Martinc, P. & Brito, L. (2006). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 106, 111-121. Acedido em Outubro, 2, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505004186>
- Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C., Becroft, D., Dove, B., Farmer, K., Tonkin, S., Yeates, N., Stamp, R. & Mickleson, K. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. [abstract] [versão electrónica]. In *Pediatric Infectious Diseases*, 3(1), 30-34. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6701102>
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. & Broome, C. V. (1988). Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese. *New England Journal of Medicine*. 319, 823-828. Acedido em Setembro, 11, 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM198809293191303>
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
- Liu, D. (2008). Epidemiology. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.
- Liu, D., Lawrence, M. L., Pinchuk, L. M., Ainsworth, A. J. & Austin, F. W. (2007). Characteristics of cell-mediated, anti-listerial immunity induced by a naturally avirulent *Listeria monocytogenes* serotype 4a strain HCC23 [abstract] [versão electrónica]. *Archives of Microbiology*, 188(3), 251-256. Acedido em Setembro, 27, 2011, disponível em <http://www.springerlink.com/content/552472x15678353k/>
- Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 24(1), 1-11. Acedido em Setembro, 23, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/24/1/1.long>

- Low, C. & Linklater, K. (1985). Listeriosis in sheep. *Practice*, 7, 66–67. Acedido em Novembro, 5, 2011, disponível em <http://inpractice.bmj.com/content/7/2/66.extract>
- Ludwig, W., Schleifer, K. & Whitman, W. B. (2009). Family III. Listeriaceae. In Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (2nd Edition), Georgia: Springer.
- Lundén, J., Tolvanen, R. & Korkeala, H. (2004). Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, 6-12.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H. & Siitonen, A. (2000). An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *Journal Infectious Diseases*, 181, 1838–1841. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://jid.oxfordjournals.org/content/181/5/1838>
- MacDonald, P. D., Whitwam, R., Boggs, J., MacCormack, J., Anderson, K., Reardon, J., Saah, J., Graves, L., Hunter, S. & Sobel, J. (2005). Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. [abstract] [versão electrónica]. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 677–682. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/40/5/677.short>
- Magalhães, R., Barbosa, J., Santos, I., Almeida, G. e Teixeira, P. (2008). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from human cases of listeriosis occurred in Portugal in 2008. Acedido em Dezembro, 3, 2011, disponível em http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5652/1/com-int_2010_esb_1062_Almeida_Gon%C3%A7alo_30.pdf
- Makaryus, A. N., Yang, R., Cohen, R., Rosman, D., Mangion, J. & Kort, S. (2004). A Rare Case of *Listeria monocytogenes* Presenting as Prosthetic Valve Bacterial Endocarditis and Aortic Root Abscess. *Echocardiography*, 21(5), 423-427. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0742-2822.2004.03093.x/full>
- Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S. & Igimi, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 189–196. Acedido em Outubro, 3, 2011, disponível em http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271249&_user=2459750&_pii=S0168160505002497&_check=y&_coverDate=2005-10-

[15&view=c&wchp=dGLzVBA-zSkzV&md5=a1d04086c08a6fb13eb03a1d9915f9b1/1-s2.0-S01681605002497-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S01681605002497-main.pdf)

- Marco, A.J., Prats, N., Ramos, J.A., Briones, V., Blanco, M., Dominguez, L. & Domingo, M. (1992). A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Comparative Pathology*. 107 (1), 1-9. Acedido em Setembro, 14, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002199759290090H>
- Mazzulli, T. & Salit, I. E. (1991). Pleural Fluid Infection Caused by *Listeria monocytogenes*: Case Report and Review. [abstract] [versão electrónica]. *Clinical Infectious Diseases*, 13(4), 564-570. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/13/4/564.short>
- McLauchlin, J. (1990). Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases: 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. [abstract] [versão electrónica]. *Epidemiol. Infect.* 104, 191–201. Acedido em Setembro, 12, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4702332>
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7, 187. Acedido em Agosto, 10, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713596000382>
- McLauchlin, J., Greenwood, M. H. & Pini, P. N. (1990). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. [abstract] [versão electrónica]. *Int. J. Food Microbiol.*, 10, 255–262. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059090073E>
- McLauchlin, J., Hall, S. M., Velani, S. K., Gilbert, R. J. (1991). Human listeriosis and paté: a possible association. *British Medical Journal*, 303, 773-775. Acedido em Outubro, 2, 2011, disponível em <http://www.bmj.com/content/303/6805/773.full.pdf>
- McLauchlin, J. & Low, J. C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. [abstract] [versão electrónica]. *Veterinary Record*, 135, 615-617. Acedido em Agosto, 10, 2011, disponível em <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/135/26/615.abstract>
- Mead, P. S., Dunne, E. F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B. D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Sluesker, L. & Swaminathan, B. (2006). Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. [abstract] [versão electrónica]. *Epidemiology and Infection*, 134, 744-751. Acedido em Outubro, 4 ,

2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=449842>

- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Robert V. Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging. Infecious. Diseases*, 5(5), 607-625. Acedido em Agosto, 10, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627714/>
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Giggs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food microbiology*, 21, 213-216.
- Miettinen, M., Bjorkroth, K. J., & Korkeala, H. J. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 187. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160598001858>
- Morrison, R. E., Brown, J. & Goodling, R. S. (1980). Spinal cord abscess caused by *L. monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. In *Arch. Neurol.*, 37, 243-244. Acedido em Setembro, 19, 2011, disponível em <http://archneur.ama-assn.org/cgi/content/abstract/37/4/243>
- Motarjemi, Y. & Käferstein, F. (1999). Food safety, Hazard Analysis and Critical Control Point and the increase in foodborne diseases: a paradox?. *Food Control*, 10, 325-333. Acedido em Novembro, 9, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713599000080>
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 407-439. Acedido em Abril, 27, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700290409/abstract>
- Navarro-Martínez, A., Gómez-Merino, E., Gómez-Garrido, M. & Fernández-Fúnez. (2001). A. Aortitis por *Listeria monocytogenes*. *Revista Clínica Española*, 201(8), 490. Acedido em Setembro, 20, 2011, disponível em <http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/65/65v201n08a13017437pdf001.pdf>
- Nolla-Salas, J., Anto, J. M., Almela, M., Coll, P., Gasser, I. & Plasencia, A. (1993). Incidence of listeriosis in Barcelona, Spain, in 1990. The collaborative study group of listeriosis of Barcelona. [abstract] [versão electrónica]. *European Journal of Clinical*

Microbiology & Infectious Diseases, 12, 157-161. Acedido em Setembro, 28 , 2011, disponível em <http://www.springerlink.com/content/gk917k5918638601/>

Nyfeldt, A. (1929). Etiologie de la mononucleose infecteuse, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 101, 590.

Nørnung, B., Andersen, J. K., Schlundt, J. (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 195-203. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599001579>

OIE Terrestrial Manual 2008 (2008). *Listeria monocytogenes*. Acedido em Outubro, 6 , 2011, disponível em http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf

Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. & Igimi, S. (2004). Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. [abstract] [versão electrónica]. *Epidemiology and Infection*, 132, 769-772. Acedido em Outubro, 2, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=234721>

Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G. A., Frye, D. M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T. F., LaPorte, T. N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D. J., Huang, A. J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E. R., Holcomb, M. E., Woron, R. F., Zansky, S. M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A. R., Tucker, N., Hynes, N. A. & Meada, P. (2005). Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infection Linked to Delicatessen Turkey Meat. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 962-967.

Ooi, S.T. & Lorber, B. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40 (9), 1327-1332. Acedido em Setembro, 23, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/40/9/1327.full.pdf+html>

Owen, C. R., Meis, A., Jackson, J. W. & Stoenner, H. G. (1960). A Case of Primary Cutaneous Listeriosis. *New England Journal Medicine*, 262, 1026-1028. Acedido em Setembro, 23 , 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM196005192622007>

Painter, J. & Slutsker, L. (2007). Listeriosis in Humans. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press.

- Peel, M., Donachie, W. & Shaw, A. (1988). Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *Microbiology*, 134 (8), 2171-2178. Acedido em Outubro, 24, 2011, disponível em <http://mic.sgmjournals.org/content/134/8/2171.full.pdf+html>
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B. & Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. [abstract] [versão electrónica]. *Canadian Journal of Microbiology*. 35(2), 245-254. Acedido em Julho 31, 2011, disponível em <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m89-037>
- Pini, P. N. & Gilbert, R. J. (1988) The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. [abstract] [versão electrónica]. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 317–326. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160588900256>
- Pirie, J. H. H. (1927). A new disease of veld rodents." Tiger River Disease". *S. Afr. Inst. Med. Res.* 3. Acedido em Abril 27, 2011, disponível em <http://www.bmj.com/content/2/3477/350.full.pdf>
- Pirie, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria [abstract] [versão electrónica], *Nature*, 145, 264. Acedido em Abril 27, 2011, disponível em <http://www.nature.com.ep.fjernadgang.kb.dk/nature/journal/v145/n3668/abs/145264a0.html>
- Premaratne, R. J., Lin, W. J. & Johnson, E.A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3046–3048. Acedido em Julho 20, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160596012056>
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J., Berche, P. & Gaillard, J. (1998). Comprehensive Study of the Intestinal Stage of Listeriosis in a Rat Ligated Ileal Loop System. [abstract] [versão electrónica]. *Infect Immun.* 66 (2), 747-755. Acedido em Setembro, 14, 2011, disponível em <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/66/2/747>
- Racz, P., Tenner, K. & Mero, E. (1972). Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. [abstract] [versão electrónica]. *Lab. Investig.* 26, 694–700. Acedido em Setembro, 14, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L 338. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 852/2004 da Comissão de 29 de Abril relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L 139. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

Riedo, F. X., Pinner, R. W., Tosca, M. L., Cartter, M. L., Graves, L. M., Reeves, M. W., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D. & Broome, C. V. (1994). A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Infectious Diseases*. 170, 693–696. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://jid.oxfordjournals.org/content/170/3/693.short>

Rocourt, J. (1996). Risk factors for listeriosis. *Food Control*. 7, 195–202.

Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. & Piffaretti, J. (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single Species, *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42, 171-174. Acedido em Abril, 18, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/content/42/1/171.full.pdf+html>

Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007). The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press.

Rocourt, J., Goulet, V., Lepoutre-Toulemon, A., Jacquet, C., Catimel, B., Rebiere, I., Miegerville, A.F., Courtieu, A.L., Pierre, O., Dehaumont, P. & Veit, P. (1993). Outbreak of listeriosis en France, 1992. [abstract] [versão electrónica]. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 23 (3), 481-484. Acedido em Setembro, 13, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X05808327>

Rocourt, J. & Grimont, P. A. D. (1983). *Listeria welshimeri* sp. nov. e *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33, 866 – 869. Acedido em Abril 18, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/33/4/866>

Rocourt, J., Hof, H., Schreltenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, H. (1986). Meningite purulente aigue à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompetent, Schweiz. *Med. Wochenschr.*, 116, 248.

Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3), 197-209. Acedido em Setembro, 27, 2011, disponível em http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500003366#ref_BIB15

- Rocourt, J. & Seeliger, H.P. (1985). Distribution of species of the genus *Listeria* [abstract] [versão electrónica]. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 259, 317. Acedido em Acedido em Agosto, 15, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4050194>
- Salamina, G., Donne, E. D., Niccolinia, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., & Binkin, N. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection*, 117, 429-436.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F. & Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (3), 669-74. Acedido em Julho. 27, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/content/46/3/669.long>
- Schlech, W. F. (2000). Foodborne Listeriosis *Clinical Infectious Diseases*, 31 (3), 770-775. Acedido em Setembro, 25 , 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/31/3/770.full.pdf+html>
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. H., King, Nicholls, E. S. & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. [abstract] [versão electrónica]. *New Engl. J. Med.* 308, 203–206. Acedido em Outubro, 5 , 2011, disponível em <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM198301273080407>
- Schoder, D., Melzner, D., Schmalwieser, A., Zangana, A., Winter, P. & Wagner, M. (2011). Important Vectors for *Listeria monocytogenes* Transmission at Farm Dairies Manufacturing Fresh Sheep and Goat Cheese from Raw Milk. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of Food Protection*, 74, 6, 919-924. Acedido em Agosto, 15, 2011, disponível em <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2011/00000074/00000006/art00008>
- Schuchat, A., Deaver, K. A., Wenger, J. D., Plikaytis, B. D., Mascola, L., Pinner, R. W., Arthur L., Reingold, A. L., Claire V. Broome, C. V., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Graves, L., Pierce, R., Przybyszewski, V., Ransom, R., Reeves, M., Weaver, R., Anderson, G., Stone, E., Krauss, K., Castillon, M., Harvey, C., Stull, T., Stephens, D., Farley, M., Archer, P., Strack, J., Istre, G., Rados, M., Taylor, J., Lefkowitz, L. (1992). Role of Foods in Sporadic Listeriosis - Case-Control Study of Dietary Risk Factors. [abstract] [versão electrónica]. *Journal of the American Medical Association*, 267(15), 2041-2045. Acedido em Outubro, 25, 2011, disponível em <http://jama.ama-assn.org/content/267/15/2041.short>
- Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(2), 169-183. Acedido em Setembro, 10, 2011, disponível em <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/4/2/169>

- Seeliger, H. P. R. (1981). Nonpathogenic listeriae: *L. innocua* sp. n. [abstract] [versão electrónica]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 249, 487-493. Acedido em Abril 18, 2011, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Seeliger.%201981.%20Apathogen%20Listerien>
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schertrnrunner, A., Grimont, P. A. D. & Jones, D. (1984). *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 336-337. Acedido em Abril 18, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/34/3/336>
- Seeliger, H. P. H. & Bockemühl, J. (1968). Critical studies on the question of acapsular formation in *Listeria monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. *Zentralbl Bakteriol Orig.* 206 (2), 216-27. Acedido em Abril 20, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4974253>
- Siddiqi, R. & Khan, M. A. (1989). Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. [abstract] [versão electrónica]. *Zentralbl Bakteriol.* 271(2), 146-52. Acedido em Julho 19, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2505787>
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M., Hudson, J.A. (2002). Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (5), 409–413. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2002.01207.x/full#t2>
- Simón, M. & Ferrer, D. M. (1998). Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain) *International Journal of Food Microbiology*, 44, 141-144. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059800097X>
- Suihko, M.L., Saloa, S., Niclasenb, O., Gudbjörnsdóttirc, B., Torkelssonc, G., Bredholtd, S., Sjöberga, A., Gustavssone, P. (2002). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry, and seafood industries by automated ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 137. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501006316>
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243. Acedido em Outubro, 3, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457907001876>

- Taillefer, C., Boucher, M., Laferrière, C. & Morin, L., (2010). Perinatal Listeriosis: Canada's 2008 Outbreaks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32, 45-48. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em http://www.sogc.org/jogc/abstracts/full/201001_CaseReport_1.pdf
- Thimothe, J., Walker, J. & Suvanich, V. (2002) Detection of *Listeria* in Crawfish Processing Plants and in Raw, Whole Crawfish and Processed Crawfish (*Procambarus spp.*). *Journal of Food Protection*, 65(11), 1735-1739. Acedido em Novembro, 8, 2011, disponível em <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2002/00000065/00000011/art00009>
- Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *JCB*. 109 (4), 1597-1608. Acedido em Setembro, 18, 2011, disponível em <http://jcb.rupress.org/content/109/4/1597.full.pdf+html>
- Todda, E.C.D., Notermansb, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22 (9), 1484-1490. Acedido em Outubro, 5, 2011, disponível em http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510002422#ref_bib4
- Valk, H., Vaillant, V., Jacquet, C., Rocourt, J., Querrec, F., Stainer, F., Quelquejeu N., Pierre, O., Pierre, V., Desenclos, J.C. & Goulet, V. (2001). Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999–February 2000. *Am. J. Epidemiol.*, 154, 944–950. Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://aje.oxfordjournals.org/content/154/10/944.full.pdf+html>
- Valk, H. de, Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J. C., Martin, P. (2005). Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Eurosurveillance*, 10, 10. Acedido em Novembro, 4, 2011, disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=572&LanguageId=2>
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (3), 584-640. Acedido em Setembro, 11, 2011, disponível em <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/14/3/584~>
- Vít, M., Olejník, R., Dlhý, J., Karpíšková, R., Částková, J., Příkazský, V., Příkazská, M., Beneš, Č. & Petráš, P. (2007). Outbreak of listeriosis in the Czech Republic, late 2006 – preliminary report. *Eurosurveillance*, 12 (6). Acedido em Outubro, 4, 2011, disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3132#1>

- Vogel, B. F., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. & Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. [abstract] [versão electrónica]. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2586. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/67/6/2586>
- Wagner, M. & McLauchlin, J. (2008). Biology. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.
- Weinberg, E.D. (1984). Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. [abstract] [versão electrónica]. *Clinical Infectious Diseases*, 6 (6), 814-831. Acedido em Setembro, 23, 2011, disponível em <http://cid.oxfordjournals.org/content/6/6/814.short>
- Welshimer, H. J. & Meredith, A. L. (1971). *Listeria murrayi* sp. n.: a Nitrate Reducing Mannitol Fermenting *Listeria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21, 3-7. Acedido em Abril 18, 2011, disponível em <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/21/1/3>
- Wesley, I. V. (2007). Listeriosis in animals. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press.
- World Health Organization (WHO) Working Group (1988). Foodborne listeriosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 66 (4), 421-428. Acedido em Agosto, 12, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2491161/pdf/bullwho00069-0002.pdf>
- World Health Organization Working Group (2000). *Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8th Report 1999-2000*. Acedido em Outubro, 26, 2011, disponível em <http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/por.pdf>
- World Health Organization (2008) *Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control*. Acedido em Fevereiro, 22, 2012, disponível em http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L. & Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.*, 65, 2707- 2716. Acedido em Novembro, 4, 2011, disponível em <http://iai.asm.org/content/65/7/2707.full.pdf+html>

- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolvertton, C. J. (2008). *Prescott, Harley and Klein's Microbiology* (7th edition). New York: McGraw-Hill
- Wilson, I. G. (1996). Occurrence of *Listeria* species in prepacked retail sandwiches. [abstract] [versão electrónica]. *Epidemiol. Infect.*, 117, 89–93. Acedido em Agosto, 16, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=1341096>
- Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2010). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. In *LWT - Food Science and Technology*, 44, 351-362.

Anexos

Anexo I

Protocolo experimental realizado no período de estágio na LIFE Faculty, Universidade de Copenhaga

As amostras, após um período de pré-enriquecimento em meio Half Frasier de 24 horas e 48 horas, foram semeadas nos meios de cultura selectivos de ALOA (Agar *Listeria* Ottavani & Agosti) e RAPID'L.mono (Bio-Rad Laboratories, USA). A amostra positiva foi posteriormente confirmada num meio de agar sangue e pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) (primers *hly* e *plcB*), após extracção do ADN (Ácido desoxirribonucleico). Foi efectuada uma nova pesquisa proveniente da amostra positiva e esta foi pré-enriquecida em meio de Half Frasier em diferentes tempos (0, 1, 4 e 12 horas), várias colónias foram isoladas a partir desses meios e, após extracção do ADN, foi realizada a técnica de multiplex-PCR, com base no artigo *Differentiation of the Major Listeria monocytogenes Serovars by Multiplex PCR* (Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet & Martin, 2004) (primers *Imo 0730*, *ORF 2819*, *ORF 2110*, *Imo 1118* e *prs*) de modo a caracterizar o serótipo das colónias de *Listeria monocytogenes*.

Anexo II

Tabela referente aos surtos de listeriose detectados de 1979 a 2011

Ano	Localização	Nº de casos (nº mortos)	Alimento associado (ou provável)	Serótipo envolvido	Período de incubação	Tipo de sintomatologia	% casos período perinatal	Referência
1979	Massachusetts , EUA	20 (5)	(Vegetais crus)	4b	?	Gastrointestinal	?	Ho et al., 1986
1980	Nova Zelândia	29 (9)	(Marisco, peixe cru)	1b	?	Nervosa e perinatal	76%	Lennon et al., 1984
1981	Canadá	41 (18)	Colesaw	4b	?	Nervosa e perinatal	83%	Schlech et al., 1983
1983	Massachusetts , EUA	49 (14)	Leite pasteurizado	4b	?	Nervosa e perinatal	14%	Fleming et al., 1985
1985	Califórnia, EUA	142 (48)	Queijo fresco mexicano	4b	31 ou 35 dias	Nervosa e perinatal	66%	Linnan et al., 1988

1986	Áustria	28 (5)	Leite e vegetais crús	1/2a, 4b	?	Nervosa e perinatal	86%	Allerberger & Guggenbichler, 1989
1983- 1987	Suíça	122 (34)	Queijo de pasta mole	4b	?	Nervosa e perinatal	53%	Büla et al., 1995
1987- 1989	Reino Unido	366 (?)	Paté	4bx	?	Nervosa e perinatal	?	McLauchlin et al., 1991
1989	Connecticut, EUA	10 (0)	(Camarão)	4b	2 dias	Gastrointestinal	33%	Riedo et al., 1994;
1989- 1990	Dinamarca	26 (7)	(Queijo azul)	4b	?	Nervosa e perinatal	12%	Jensen, Frederiksen & Gerner-Smidt, 1994
1992	França	279 (85)	Língua de porco em gelatina	4b	?	Nervosa e perinatal	33%	Jacquet et al., 1995
1993	França	38 (10)	<i>Rillettes</i> (paté de porco)	4b	21 dias	Nervosa e perinatal	82%	Goulet et al., 1998

1993	Itália	18 (0)	Salada de arroz	1/2b	18 horas (11-60h)	Gastrointestinal	0%	Salamina et al., 1996
1994	Illinois, EUA	45 (0)	Leite com chocolate pasteurizado	1/2b	20 horas (9-31h)	Gastrointestinal	0%	Dalton et al., 1997
1994	Suécia	9 (1)	Truta arco-íris	4b	?	Nervosa e perinatal	33%	Ericsson et al., 1997
1995	França	37 (11)	Queijo de pasta mole produzido com leite cru	?	?	Nervosa e perinatal	?	Lundén et al., 2004; Health Canada, 2010
1997	Itália	1566	Salada de atum e milho	4b	24 horas (12-51h)	Gastrointestinal	0%	Aureli et al., 2000
1998-1999	Vários Estados, EUA	108 (14)	Salsichas frankfurt	4b	?	Nervosa e perinatal	?	Graves et al., 2005; Mead et al., 2006
1998-1999	Finlândia	25 (6)	Manteiga	3a	?	Nervosa e perinatal	0%	Lyttikainen et al., 2000

1999-2000	França	10 (3)	<i>Rillettes</i>	4b	?	Nervosa e perinatal	30%	Valk et al., 2001
1999-2000	França	32 (10)	Língua de porco em gelatina	4b	?	Nervosa e perinatal	28%	Valk et al., 2001
2000	Nova Zelândia	30 (0)	Carne enlatada e fiambre	1/2	24 horas (12 - 101h)	Gastrointestinal	0%	Sim et al., 1999
2000	Vários Estados, EUA	30 (7)	Perú (pronto-a-comer)	1/2a	?	Nervosa e perinatal	27%	Olsen et al., 2005
2000	Carolina do Norte, EUA	13 (5)	Queijo fresco mexicano	4b	?	Nervosa e perinatal	85%	MacDonald et al., 2005
2001	Suécia	48(0)	Queijo fresco produzido com leite cru	1/2a	31 horas	Gastrointestinal	0%	Carrique-Mas et al., 2003
2001	Califórnia, EUA	16 (0)	Perú (pronto-a-comer)	1/2a	25 horas(6-49 h)	Gastrointestinal	0%	Frye et al., 2002

2001	Japão	38 (0)	Queijo	1/2b	<24-144 horas	Gastrointestinal	0%	Makino et al., 2005
2002	Vários Estados, EUA	54 (8)	Perú (pronto-a-comer)	4b	?	Nervosa e perinatal	22%	Gottlieb et al. 2006
2002	Canadá	17 (0)	Queijo fresco produzido com leite cru	?	?	Nervosa e perinatal	18%	Gaulin et al., 2006
2003	Texas, EUA	13 (2)	Queijo fresco mexicano	4b	?	Nervosa e perinatal		Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007
2005	Suíça	10 (3)	Queijo de pasta mole produzido com leite cru	1/2a	?	Nervosa e perinatal	20%	Bille et al., 2006
2006	República Checa	78 (13)	Queijo de pasta mole produzido com leite cru	1/2b	?	Nervosa e perinatal	32%	Vít et al., 2007
2008	Canadá	58 (20)	Carne (pronto-a-comer)	?	?	Nervosa e perinatal	5%	Taillefer et al., 2010; Health Canada, 2009

2008	Canadá	36 (1)	Queijo produzido com leite cru	?	?	Nervosa e perinatal	36%	Taillefer et al., 2010; Health Canada , 2009
2009-2010	Austria, Alemanha e República Checa	34 (8)	Queijo coalhado	1/2a	?	Nervosa e perinatal	0%	Fretz et al., 2010
2010	Louisiana, EUA	14 (2)	Queijo	1/2a	3-70 dias	Nervosa e perinatal	0%	CDC, 2011
2011	EUA	123 (25)	Melão	1/2 a e 1/2 b	?	Nervosa e perinatal	3%	CDC, 2011

Anexo III

Inquérito epidemiológico

Questionário listeriose

Referência Caso:

Por favor, preencham o questionário para todos os casos de listeriose invasiva que satisfaçam a definição de caso seguinte:

Critérios clínicos:

Pessoa que preenche pelo menos um dos três critérios seguintes:

– Listeriose do recém-nascido definida como morte neonatal ou pelo menos um dos cinco critérios seguintes no primeiro mês de vida: granulomatose infantiséptica, meningite ou meningo-encefalite, septicemia, dispneia, lesões cutâneas das membranas ou da conjuntiva;

– listeriose durante a gravidez definida por pelo menos um dos três critérios seguintes: abortamento, espontâneo ou provocado, morte neonatal ou nascimento prematuro; febre; sintomas gripais.

- Outra forma de listeriose definida por pelo menos um dos quatro critérios seguintes: febre, meningite ou meningo-encefalite, septicemia, infecções localizadas tais como artrite, endocardite, e abscessos..

.

.

Critério para diagnóstico laboratorial: Confirmação laboratorial de infecção com sintomas:

- isolamento de *Listeria monocytogenes* a partir de um local normalmente estéril (sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido pericárdico ou pleural)

ou

– isolamento de *Listeria monocytogenes* de um local normalmente não estéril proveniente de um feto, nado-morto, recém-nascido ou da mãe no prazo de 24 horas após o nascimento.

Secção 1. Detalhes do entrevistador

Caso entrevistado por:

Data da entrevista d ____ / m ____ / a

Respondente: ☐ paciente ☐ familiar ☐ cônjuge ☐ prestador de cuidados ☐ outro, especifique:

Secção 2: Informação sobre o caso:

Nome:

Referência:

Morada:

Telefone casa: _____

Telefone emprego: _____

Telemovel: _____

Médico Assistente:	Telefone do médico assistente:
Data de nascimento d ____ / m ____ / a ____ Idade : ____	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Unidade de Saúde:	Distrito:
Profissão:	Outras informações relevantes:

Secção 3. Informação Clínica:		Identificação Laboratorial:																
Tipo(s) de amostra(s) positiva(s): <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> Outra: _____		Perfil _____ PFGE: _____																
Data de colheita das amostras +: d ____ / m ____ / a ____	Comunicação de resultados em: d ____ / m ____ / a ____																	
Data de início dos sintomas: d ____ / m ____ / a ____ Recuperação em (desaparecimento dos sintomas) ? d ____ / m ____ / a ____ <input type="checkbox"/> Ainda doente <input type="checkbox"/> Desconhecido	Tipo de doença: <input type="checkbox"/> Bacteriemia/sepsis <input type="checkbox"/> Meningite <input type="checkbox"/> ITU <input type="checkbox"/> Outra: _____																	
Sintomas: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Diarreia</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> <td>Náuseas</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> </tr> <tr> <td>Dor de cabeça</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> <td>Dores musculares</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> </tr> <tr> <td>Vômitos</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> <td>Febre</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> </tr> <tr> <td>Arrepios</td> <td><input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS</td> <td>Assintomático</td> <td><input type="checkbox"/> S</td> </tr> </table> <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS Outro: _____			Diarreia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Náuseas	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Dor de cabeça	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Dores musculares	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Vômitos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Febre	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Arrepios	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Assintomático	<input type="checkbox"/> S
Diarreia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Náuseas	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS															
Dor de cabeça	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Dores musculares	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS															
Vômitos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Febre	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS															
Arrepios	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Assintomático	<input type="checkbox"/> S															
Admitido ao hospital por causa da doença? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS	Data de Admissão: d ____ / m ____ / a ____ Data de alta: d ____ / m ____ / a ____ <input type="checkbox"/> Internado na data da entrevista																	
Caso falecido? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N Data de óbito: d ____ / m ____ / a ____ Se sim, a infecção por <i>Listeria</i> foi a causa de morte? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS																		
Factores de predisposição/imunossuppressores (ex. diabetes, doença oncológica, esteroides)? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS Se sim, especifique: _____																		

Estava grávida na altura da doença? ☐ S ☐ N ☐ NS

Se sim: ☐ Ainda está grávida ☐ Morte fetal (abortamento/parto prematuro) ☐ Nado vivo

Nº de semanas de gestação _____

Se nado vivo, doença no neonato: ☐ Nenhuma ☐ Meningite ☐ Bacteriemia ☐ Gastroenterite ☐ Outro: _____

☐ Desconhecido

Se nado vivo, estado do neonato na data da entrevista ☐ recuperado ☐ ainda doente ☐ falecido

Secção 4. Vias de exposição

Nos dois meses anteriores ao início dos sintomas:

Viveu em alguma instituição comunitária? ☐ S ☐ N ☐ NS Dados da Instituição: _____
(ex. lar, hospital, prisão, internato, etc)

Viajou? ☐ S ☐ N ☐ NS Partida: d _____ / m _____ / a _____
Se sim: ☐ Portugal ☐ Estrangeiro Regresso: d _____ / m _____ / a _____
Destino (país/cidade/alajamento): _____

Teve qualquer contacto com animais ou resíduos de origem animal em casa / jardim ☐ S ☐ N ☐ NS Se sim, especifique (repteis, peixes, pássaros, gatos, cães)

Teve qualquer contacto com animais ou resíduos de origem animal fora de casa ☐ S ☐ N ☐ NS Se sim, especifique (quintas, animais selvagens, zoológico, estrumes, etc): _____

Secção 5. Compra de alimentos

Onde comprou os alimentos para consumo doméstico nos últimos **dois meses** (incluir mercearias, feiras, lojas de especialidade, banco alimentar, etc)?

Nome do estabelecimento	Localização	
A		<input type="checkbox"/> Carne <input type="checkbox"/> Frutos e vegetais <input type="checkbox"/> Outros
B		<input type="checkbox"/> Carne <input type="checkbox"/> Frutos e vegetais <input type="checkbox"/> Outros
C		<input type="checkbox"/> Carne <input type="checkbox"/> Frutos e vegetais <input type="checkbox"/> Outros

Secção 6. Alimentação fora de casa

Nos **dois meses** anteriores ao início da doença comeu em restaurantes, "fast food", pastelaria, cafeteria? ☐ S

<input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS			
Nome do Estabelecimento		Localização	Data
E			
F			
G			

Secção 7. Dietas especiais
Vegetariano? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS
Alergia a algum alimento? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS
Se sim, especifique:
Nos dois meses anteriores ao início da doença tinha alguma dieta especial? (ex dieta de diabético, kosher, halal, etc)
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> NS
Se sim, descreva:

Secção 8: História Alimentar: Comeu algum dos alimentos seguintes nos dois meses antes do início da doença?						
<p>Instruções para o entrevistador: Para cada alimento consumido, solicitar informações relativas à marca e local de compra. Em caso de morte fetal / infecção neonatal (<1 mês de idade), a mãe é o paciente, perguntar-lhe sobre sua história alimentar durante os dois meses antes do parto.</p> <p>Instruções para transmitir ao inquirido:</p> <p>Estou interessado em saber quais os alimentos que comeu durante os dois meses ante da data de início da doença. Vou fazer-lhe questões sobre a sua alimentação nos dois meses antes desta data, ou seja, de ds ____/m ____/a ____ a d ____/m ____/a ____ .</p> <p>Para cada alimento, por favor indique-me se o comeu, se não tem a certeza mas provavelmente comeu ou se não o comeu. Por favor, considere os alimentos consumidos como parte de um sanduíche, ou como parte de um outro prato, incluindo saladas.</p> <p>*Prov (Provavelmente comeu) = Pensa que comeu este alimento ou costuma comê-lo, mas não tem a certeza de o ter comido durante o período em investigação</p> <p>**NS = Não sabe se comeu durante o período em investigação</p>						
	Sim	Prov*	Não	NS*	Marca/Detalhes	Onde comprado ou consumido:
Charcutaria:						
Fiambre (porco)	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/>		

fatiado no local de compra				NS		
Fiambre (porco) embalado fatiado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Fiambre (peru) fatiado no local de compra	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Fiambre (peru) embalado fatiado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Fiambre (frango) fatiado no local de compra	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Fiambre (frango) embalado fatiado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Mortadela	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Presunto	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Chouriço/Chouriça Cru	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Chouriço/Chouriça Assado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Morcela frita	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Morcela grelhada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Morcela assada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Alheira frita	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Alheira grelhada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Alheira assada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Linguiça crua	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Linguiça grelhada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Salsicha fresca grelhada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Salsicha fresca crua	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/>		

				NS		
Pâté (não enlatado)	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Outros produtos, especialmente produtos regionais portugueses (especifique)						
Outros produtos, especialmente produtos regionais importados (especifique)						
Outros, especifique						
	Sim	Pro v*	Não	NS* *	Marca/Detalhes	Onde comprado ou consumido:
Laticínios:						
Queijo Serra da Estrela	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo de Azeitão	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo Amarelo da Beira Baixa	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo de Castelo Branco	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo S Jorge	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Outro queijo regional português - especifique	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo Brie	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo Gorgonzola	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo Camembert	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		
Queijo Mozzarella	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> NS		

Outro queijo importado-especifique	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Requeijão embalado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Requeijão não embalado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Queijo fresco embalado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Queijo fresco não embalado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Queijo amanteigado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Queijo "tipo bola"	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Queijo fatiado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Manteiga	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Leite cru	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Leite pasteurizado (leite do dia)	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Sorvete	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Bolas de gelado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Iogurte	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Outro-especifique	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
SALADAS:						
Salada de atum	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salada de marisco	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salada de feijão	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salada de couve	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N		

				S		
Salada de cogumelos	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Outro, especifique:						
	Sim	Prov*	Não	NS* *	Marca/Detalhes	Onde comprado ou consumido:
VEGETAIS:						
Rebentos de soja	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Saladas embaladas já lavadas	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Alface	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Cogumelos frescos	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salsa	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Coentros	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Manjerição	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Outro, especifique:						
PEIXE e MARISCO:						
Marisco comprado cozido (fresco ou congelado), pronto a comer (não cozinhado em casa)	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Ostras	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salmão fumado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Sushi	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Outro, especifique:						
FRUTA:						

Melão comprado inteiro	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Melão comprado partido	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Meloa comprada inteira	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Meloa comprada partida	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Melancia comprada inteira	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Melancia comprada partida	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Morangos	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salada de fruta preparada na hora	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Salada de fruta comprada embalada	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Sumo de fruta natural preparado na hora	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Sumo de fruta natural embalado	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> P	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> N S		
Outro, especifique						

Comentários